

München, 1960.

Die Widerstandsfähigkeit der Tauben
gegen Insulin im Zusammenhang mit den
 α -Zellen der Langerhans'schen Inseln

Abd elmonen Ibrahim Al-Gauhari

DIE WIDERSTANDSFÄHIGKEIT DER TAUBEN GEGEN INSULIN IM
ZUSAMMENHANG MIT DEN α -ZELLEN DER LANGERHANS'SCHEN INSELN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
der
LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT
zu München

vorgelegt von
Abd elmonem Ibrahim Al-Gauhari
aus
Mit Ghamr - Ägypten
(UAR)

Dezember 1959

Berichterstatter: Prof. Antoon

Tag der mündl. Prüfung: 25.5.1960



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.	1
II. EXPERIMENTELLER TEIL.	7
I) PHYSIOLOGIE	7
A) Verwendete Tiere und Methoden	7
1) Auswahl und Vorbereitung der Tiere . .	7
2) Technik der Entnahme von Blutproben zur Bestimmung des Blutzuckers	8
3) Die Bestimmung des Blutzuckergehalts .	10
4) Die Bestimmung der Insulin-Einheiten .	11
5) Die Herstellung der Rohkonzentration von Taubenpankreasextrakt.	13
B) Ergebnisse	
1) Der Einfluß von Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen	18
2) Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Kaninchen . . .	23
3) Der Einfluß von insulinfreiem Tauben- glucagon auf den Blutzucker der Kaninchen.	27
4) Normal-Blutzucker der Tauben und Restreduktion.	32
5) Der Einfluß verschiedener Mengen Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Tauben	35
6) Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Tauben.	39
7) Die Wirkung von insulinfreiem Tauben- glucagon auf den Blutzucker der Tauben	42

II) ELEKTROPHORESE:

Die elektrophoretische Trennung des Kalbsinsulins, Taubenpankreasextrakts und Taubenglucagons

A) Allgemeines	47
B) Beschreibung der Methodik.	49
C) Ergebnis	52
1) Trennung von reinem Kalbsinsulin. . .	52
2) Trennung von Taubenpankreasextrakt. .	52
3) Trennung vom Taubenglucagon	54

III) HISTOLOGIE

A) Allgemeines	56
B) Beobachtungen.	58

IV) DISKUSSION 61

V) ZUSAMMENFASSUNG 71

VI) LITERATURVERZEICHNIS. 73

LEBENS LAUF. 80

I. Einleitung und Problemstellung

Historisches

A. Physiologie

Es ist bekannt, daß der Blutzuckerspiegel bei allen Arten der Säugetiere sehr beständig ist. Auch bei anderen Wirbeltiergruppen (Amphibien, Reptilien und Vögeln) haben viele Untersuchungen einen beständigen Blutzuckerspiegel ergeben, obwohl die Abweichungen innerhalb jeder Art insgesamt größer erscheinen als bei den Säugetierarten (Beutler 1939). Gerade bei den Säugetieren weiß man, daß der Blutzuckerspiegel der hormonalen Kontrolle durch Insulin, Adrenalin und einigen Hormonen der Schilddrüse und Hypophyse unterliegt (Starling 1941, MacDowell 1950).

Die ersten Arbeiten über Blutzucker bei Vögeln liegen schon sehr weit zurück. Heute gibt es davon eine reichhaltige Literatur. Die für Vögel mitgeteilten Normalwerte schwanken zwischen 0,05 - 0,43 %. Dies haben Erlenbach 1938 und von Buddenbrock 1950 bei Schwänen, Gänsen, Enten, Hühnern, Tauben, Weihen, Wachteln und einer Anzahl kleinerer Vögel festgestellt.

Der Blutzucker bei Vögeln unterliegt vielen Einflüssen (Beutler 1939):

1. Veranlagung und Erbllichkeit

Riddle und Honeywell haben 1922 bei Tauben eine starke Veranlagung für hohen oder niedrigen Blutzuckergehalt festgestellt. Verschiedene untersuchte Taubenrassen, die in der Kreuzung fruchtbar waren, haben einen verschieden "normalen" Blutzuckerspiegel.

2. Alter

Hühner- und Taubenembryonen haben etwas niedrigere Werte als ausgewachsene Vögel (Riddle und Honeywell 1922).

3. Geschlecht

Das Geschlecht ist ohne Einfluß auf den Blutzucker-gehalt. Eine Ausnahme macht das Haushuhn. Hier hat der Hahn regelmäßig niedrigere Werte als die Henne (Erlenbach 1938).

4. Physiologischer Zustand

Bei der Taube führt jede Ovulation zu einer Hebung des Blutzuckerspiegels um etwa 20% (Riddle und Honeywell 1922). Deshalb ist es für viele Versuche mit Tauben besser, nur Männchen zu verwenden.

5. Temperatur

Vögel zeigen im allgemeinen in der Kälte weniger Blutzucker als in der Wärme (Riddle und Honeywell 1922, Erlenbach 1938).

6. Ernährungszustand

Je kleiner die Vögel sind, desto geringer scheint ihre Fähigkeit zu hungern. Die Taube zeigt nach 28 Stunden Unregelmäßigkeit des Blutzuckerspiegels (Honeywell 1921).

7. Psychische Erregung

Vögel scheinen niemals psychische Hyperglykämie zu zeigen. Weder Jagen, Festhalten oder Elektrisieren, was bei Säugern regelmäßig den Blutzucker steigen läßt, hatten eine Wirkung (Koppányi u. Mitarb. 1926, Sprague und Ivy 1936, Erlenbach 1938).

8. Hormonale Versorgung der Gewebe

Tauben (Minkowski 1893), Enten (Minkowski 1893, Kausch 1897, Sprague und Ivy 1936) und junge Hühner (Sprague und Ivy 1936) scheiden nach Pankreatectomie keinen Zucker aus oder es tritt nur eine geringe anfängliche Hypergly-

kämie auf, die rasch wieder verschwindet. Bei allen Vögeln treten wegen der fehlenden Darmfermente allmählich Verdauungsstörungen auf. Hungrige Tiere sind empfindlicher als normale, mit Kohlehydraten gut genährte Tiere (Honeywell 1921).

Die Vögel erweisen sich als widerstandsfähig gegen das Insulin. Das ist von allen Autoren beobachtet worden. Eine besondere Widerstandskraft besitzt die Taube (Honeywell 1921, Honeywell und Riddle 1922, Houssay, Sordelli und Mazzocco 1923, Cassidy und Mitarb. 1925, Markowitz 1925, Zagami 1927, Chen, Anderson und Maze 1945, La Grutta 1951), die erst nach der 6-30fachen für das Kaninchen tödlichen Dosis stirbt und die 4-5fache Kaninchendosis braucht, um den Blutzucker auf 0,05 % zu senken. Die hohe Körpertemperatur der Vögel soll nach Markowitz 1925 nicht dafür verantwortlich sein, daß das Insulin im Körper der Vögel so anders wirkt als im Körper der Säuger. Er schließt das daraus, daß die Insulinwirkung im Körper der Katze unverändert bleibt, auch wenn man ihre Körpertemperatur auf über 42^D C steigert. Vhen und seine Mitarbeiter haben 1945 gefunden, daß die hypoglykämischen Krämpfe nach Einspritzungen mit 400 bis 1200 Insulineinheiten pro kg Körpergewicht eingetreten sind.

B. Elektrophorese

Die Ableitung der Konstitutionsformel des Insulins nach Sanger und Mitarbeitern 1955, die als weitgehend gesichert gilt, beruht zu einem wesentlichen Teil auf einer oxydativen Aufspaltung der Disulfidbrücken mittels Perameisensäure (Sanger 1949) und der Untersuchung der dabei freiwerdenden Einzelketten, die als Fraktion A (Sanger

und Thompson 1953) und als Fraktion B (Sanger Tuppy 1951) unterschieden werden. Unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 6000, der bisher kleinsten Einheit, in die Insulin zu dissoziieren vermag (Harfenist und Craig 1922, und Fredericq 1953) würde Insulin aus je einer Kette von Fraktion A und B, unter Zugrundelegung des früher (Oncley 1940) angenommenen Molekulargewichts von 12000 dagegen aus je 2 Ketten A und B bestehen. Die Trennung der Fraktionen A und B nach Sanger 1949 beruht auf einer Fraktionierung bei verschiedenem pH, wobei im wesentlichen von der geringen Löslichkeit der Fraktion B im isoelektrischen Bereich Gebrauch gemacht wird. Da in dem angewandten vielstufigen Fraktionierungsgang eine Reihe von Zwischenfraktionen anfallen, die als Mischungen aus A und B betrachtet und nicht näher untersucht wurden, beträgt die Ausbeute an Fraktion A und B zusammen nur wenig über 50% der eingesetzten Menge.

Eine Trennung der Fraktion A und B gelingt überraschend leicht und vollkommen quantitativ durch kontinuierliche Elektrophorese nach Grassmann, Hannig, Strobel und Plöckl 1956 in n-Ameisensäure. Fraktion A wandert hierbei anionisch, Fraktion B kationisch, wie dies nach der Aminosäureanalyse zu erwarten ist. Die elektrophoretische Trennung des Rohinsulinextrakts in die zwei Komponenten, das Insulin und das Glucagon, gelangt durch Sutherland und Cori 1949, Steigerwald und Schütte 1953 und Bromer und Mitarb. 1957 aus Rohinsulinlösung von Kälberdrüsen.

Hierbei entstehen vier Fraktionen, zwei stellen das Insulin dar und die anderen zwei Fraktionen stellen das Glucagon dar. Bis jetzt wurde keine Arbeit über die Trennung des Rohinsulinextrakts der Vögel veröffentlicht. Bromer und seinen Mitarbeitern gelang im Jahre 1957 die elektrophoretische Trennung des Kalbsglukagons in zwei Fraktionen.

C. Histologie

Die Bauchspeicheldrüse erreicht bei der Taube im Verhältnis zum Gesamtkörper eine ganz erhebliche Grösse und fällt sofort nach Eröffnung der Bauchhöhle als 5 - 6 cm langer und ebensoviel mm breiter weißlicher Körper auf, der sich zwischen die beiden Schenkel der Duodenalschlinge von ihrem, in der rechten Bauchhälfte gelegenen Scheitel bis etwas über die Umknickungsstelle hinüber erstreckt. Heben wir die Schlinge hoch, so erscheint außer diesem ventralen Pankreas auf der Dorsalfläche noch ein dorsales Pankreas (Krause 1922), und außerdem ein drittes kleines schmales Band, das vom Pankreas aus näher zur Milz hin liegt.

Die Langerhans'schen Inseln führt das Pankreas der Taube in wechselnder Zahl, und zwar sind sie im ventralen Pankreas klein und spärlich, im dorsalen größer und zahlreicher (Krause 1922). Im Pankreas der Taube ist das der Milz nähere vordere Ende durch eine Anzahl größerer Inseln charakterisiert, die meist am entgegengesetzten Ende der Drüse fehlen (Vincent und Thompson 1908, Miller 1942). Lane 1907 und Bensley 1911 wiesen zwei verschiedene Zellarten in den Inseln nach. Kumagai und Ukai betrachteten es 1930 als eine wesentliche Tatsache, daß bei der Taube in den Inseln aller Größenstufen die α -Zellen in viel größerer Zahl vorhanden sind als die β -Zellen und den größeren Teil der Gesamtheit der Inseln bilden. Während im Gegensatz dazu bei anderen Tieren die α -Zellen in viel geringerer Zahl auftreten und die β -Zellen viel häufiger sind. Im ganzen nehmen die Inseln einen großen Teil des kleinen Dorsallappens ein, der große Gruppen von α -Zellen enthält, die in anderen Lappen nicht angetroffen werden.

Es kann also histologisch betrachtet kein Zweifel sein, daß eine große Zahl von Inseln vorwiegend aus α -Zellen besteht.

Nach diesen einleitenden Feststellungen will ich das Problem der Widerstandsfähigkeit der Taube gegen Insulin im Zusammenhang mit den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln betrachten. Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Teilen:

1. die Physiologie,
2. die Elektrophorese,
3. die Histologie.

Auf den folgenden Seiten will ich versuchen, diese drei Teile ausführlich zu behandeln.

Meiner verehrten Lehrerin, Frau Professor Dr.R. Beutler, danke ich für die Überlassung des Themas und für die stetige Hilfe, die sie mir bis zu ihrem Tode gewährte. Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Zoologischen Institut der Universität München bin ich Herrn Prof.Dr.K. von Frisch und Herrn Prof.Dr.H.Autrum herzlich verbunden.

II. Experimenteller Teil

I) Physiologie

A) Verwendete Tiere und Methoden

Die Versuche wurden mit der Haustaube *Columba Livia domestica* (Ordnung Columbiformes, Überordnung Neognathae, Unterklasse Neorniths) durchgeführt.

Die Tauben sind in sehr vielen Gattungen und Arten fast über die ganze Erde verbreitet. Besonders artenreich sind sie im indoaustralischen Gebiet. Die Mehrzahl ist dem Baumleben angepaßt, wenige Arten sind Fels- und Bodenvögel. Unsere Tauben sind Bodenvögel und ausschließlich Pflanzenfresser (Kükenthal 1927-1934).

1) Auswahl und Vorbereitung der Tiere

Die zur Arbeit benötigten Tiere waren Tauben und Kaninchen. Die Tauben wurden im Laboratorium gekäfigt, bis sie sich an ihre Umgebung gewöhnt hatten. Außerdem nahm ich sie häufig in die Hand, um sie auch an mich zu gewöhnen und damit Ergebnisse so klein als möglich zu halten, die durch Angst auftreten könnten (Honeywell 1921). In den meisten Fällen ließen sich die Vögel ohne Scheu greifen, wenn sie aus dem Käfig genommen wurden. In der Zeit zwischen den Versuchen wurden die Tauben in großen Käfigen gehalten, damit sie frei umherfliegen konnten. Das Futter bestand aus einer Mischung von Mais, Gerste und einigen anderen Körnern und reichlichen Mengen frischen Wassers. Das Gewicht der Tauben lag zwischen 0,29 und 0,43 kg. Das Blut wurde den Tieren ohne Betäubung entnommen.

Die Kaninchen wurden gebraucht, um die Insulinproben vergleichen zu können. Es wurden Tiere mit einem Ge-

wicht zwischen 2 und 3 kg. und großen Ohren ausgesucht. Sie bekamen täglich etwa 100 g Hafer, außerdem Heu und Grünfutter. Für jeden Versuch wurden 10-12 Kaninchen gebraucht und es war zunächst wichtig festzustellen, wie die verschiedenen Kaninchen auf das Insulin reagieren, ob eines der Tiere Verkrampfungen zeigt oder ob sie alle normal verhalten. Am Nachmittag des ersten Versuchstages wurde den Tieren das Futter aus den Ställen genommen - das Wasser blieb zurück - und am folgenden Tag wurde jedem Tier $\frac{1}{2}$ Insulineinheit unter die Haut gespritzt. Daraufhin waren innerhalb der nächsten fünf Stunden vorübergehend Krampferscheinungen zu erwarten (Burn, Finney und Goodwin 1950). Die Tiere verhielten sich jedoch alle normal.

2) Technik der Entnahme von Blutproben zur Bestimmung des Blutzuckers

Den Tauben wurde das Blut durch Anstechen der Axillargefäßvene entnommen. Dazu wurden die Daunenfedern von der Vene entfernt, die nackte Stelle mit verdünntem Alkohol gesäubert, mit Augenwatte nachgerieben und mit einer Präpariernadel eingestochen. Das Blut konnte direkt in einer natürlichen durch die beiden Flügelknochen gebildeten Tasche aufgefangen werden, und wurde daraus mit der Mikropipette entnommen (Opdyke 1942). Da das Blut langsam gerinnt, braucht kein Antigerinnungsmittel verwendet werden, wenn der erste Einstich sorgfältig vorgenommen wird, so daß er die Vene trifft.

Das Blut der Vögel enthält im allgemeinen wenig Thrombozyten (Heinzler 1956), so daß die Gerinnung sehr langsam vor sich geht. Trotzdem erschien es ratsam, die Blutproben den Tauben direkt mit der Mikropipette zu entnehmen, um die Aufbewahrung in Glasbehältern während der Entnahme zu vermeiden, was die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Blutzuckerbestimmung nur verlängert hätte.

Den Kaninchen wurde das Blut entnommen, indem sie in einen Kasten gesperrt wurden, dessen Stirnseite ein Loch hatte, aus dem die Ohren oder auch der ganze Kopf herausschauten. Dann wurde ein Ohr nach vorne gehalten, die Haare an seinem äußeren Ende mit einem Rasiermesser entfernt und die nackte Stelle sorgfältig erwärmt. Dazu wurde entweder eine elektrische Lampe ein bis zwei Minuten lang dicht an das Ohr herangebracht, oder durch Reiben erwärmt. Die Vene, die am äußeren Rande des Ohres entlangläuft, trat dann einige Minuten hervor (Burn, Finney und Goodwin 1950). Es soll hervorgehoben werden, daß die Blutentnahme in besonderem Maße von der Sorgfalt der vorherigen Erwärmung abhängt, und es ist deshalb ratsam, sich hierfür Zeit zu nehmen, ehe man punktiert. Dazu wurde am Grunde des Ohres eine Klammer auf die Vene gesetzt und mit einer ausgeglühten Präpariernadel eingestochen. Der Einstich erfolgte schräg in Richtung auf den Ohrgrund, 1-2 cm oberhalb der Klammer. Beim Herausziehen der Nadel tropfte das Blut heftig, 25-30 Tropfen sind etwa 1 ccm. Manchmal ließ das Bluten sehr schnell nach oder hörte ganz auf. Die Wunde konnte dann wieder zum Bluten gebracht werden, indem man in der Mitte des Ohres nahe am Ohrgrund mit einem Finger etwas rieb. Manchmal schloß sich die Wunde sehr schnell durch einen kleinen Schorf. Dieser wurde mit einem Wattebausch entfernt und die Nadel nochmals an der gleichen Stelle eingestochen. Um die Vene möglichst wenig zu verletzen, wurde die Nadel nicht weit eingeführt. Schließlich wurde die Klammer weggenommen und die Wunde solange mit einem Wattebausch zugedeckt, bis das Bluten aufhörte. Das Blut wurde in einem Glasschälchen mit 3 cm Durchmesser gesammelt. Die Innenseite des Schälchens wurde vorher mit einer Schicht von 10%igem Ammoniumoxalat überzogen, um die Gerinnung zu vermeiden.

Das Tauben- oder Kaninchenblut wurde mit 0,1 ccm Mikropipette aufgenommen, gewöhnlich 3-4 Proben auf einmal. Jede Mikropipette konnte nur einmal benutzt werden, da der zurückgebliebene Blutfilm die zweite Blutmenge sehr schnell gerinnen ließ.

3) Die Bestimmung des Blutzuckergehalts

Um den Blutzuckergehalt zu bestimmen, müssen zunächst die Proteine aus dem Blut entfernt werden. Dazu wurden zahlreiche Methoden ausgearbeitet. Die am meisten gebräuchlichsten schreiben vor:

1. die Anwendung von Wolframsäure (Natriumwolframat und Schwefelsäure nach Folin und Wu (1919);
2. die Anwendung von Zinksulfat (Zinksulfat und Natriumhydroxyd nach Hagedorn und Jensen 1922, Somogyi 1930);
3. den Gebrauch von Cadmium (Cadmiumsulfat und Natriumchlorid nach Fujita und Iwatake 1931).

Im allgemeinen sind Blutfiltrate, die durch Fällung der Proteine mit Zink oder Cadmiumsalzen hergestellt wurden, denen mit Wolframsäure gewonnenen Filtraten vorzuziehen (Koch und Hanke, 1948). Die Wolframsäurefiltrate von Menschenblut enthalten neben der Glucose noch eine hohe Konzentration anderer Reduktionsmittel wie Kreatinin und Glutathion, während in den nach Fällung des Proteins mit Zinksalzen hergestellten Filtraten der Anteil dieser anderen Reduktionsmittel nur klein ist oder überhaupt keine vorhanden sind (Koch und Hanke 1948). Auch für die Glucosebestimmung selbst gibt es zahlreiche Methoden. Alle haben gemeinsam, daß von der Glucose des Blutes ein alkalisches Oxydationsmittel, z.B. Ferricyanid oder ein Kupfersalz reduziert wird.

Bei der ersten Methodengruppe reduziert der Blutzucker im alkalischen Kupfersulfat zu Kupferoxyd. Das gebildete Kupferoxyd reduziert entweder Ferrisulfat zu

Ferrosulfat, das durch Titration gegen Kaliumpermanganate gemessen wird (Bertrand 1906), oder Phosphormolybdänsäure zu blauer Phosphormolybdänbronze, was colorimetrisch gemessen werden kann (Somogyi 1927, Folin 1929), oder es wird durch Bildung von freiem Jod oxydiert, das aus einer gemessenen Menge HIO_3 freigesetzt wird. Das gebildete I_2 wird durch Titration mit Thiosulfat bestimmt (Shaffer-Hartmann 1921).

Bei der zweiten Methodengruppe wird ein Teil eines abgemessenen Betrages Ferricynid vom Blutzucker reduziert und der Rest jodometrisch bestimmt.

In meiner M.Sc.Arbeit "On the blood sugar in fishes" habe ich mehrere Methoden zur Bestimmung des Blutzuckergehalts ausprobiert. Die Methode von Hagedorn und Jensen aus dem Jahre 1922 lieferte bei kleinen Fehlern die besten Ergebnisse¹⁾. Deshalb wurde sie auch hier sowohl bei Tauben als auch bei Kaninchen verwendet. Dabei wird das Protein mit Hilfe einer alkalischen Lösung von Natriumhydroxyd und Zinksulfat ausgefällt und mit Kaliumferricynid der Glucosegehalt des Blutfiltrates bestimmt.

Zunächst mußten Probetitrationsen gemacht werden, um die Reduktion der Kaliumferricyanidlösung zu verfolgen. Das freigesetzte Jod wurde mit Natriumthiosulfat titriert. Die Umkehrung der Reduktionsreaktion wird durch Fällung des Ferricyanids als Zinksalz verhindert.

4) Die Bestimmung der Insulin-Einheiten

Das Insulin wurde zuerst 1926 von Marks am Kaninchen erprobt. Seine Wirkung beruht auf dem Absenken des Blutzuckerspiegels. Nachdem die Kaninchen eine Nacht nicht gefüttert worden waren, teilte sie Marks in zwei Gruppen. Jedem Tier der ersten Gruppe wurde pro kg Kör-

1) Zeitschrift für vergleichende Physiologie, Bd.41, S.26-34 (1958)

pergewicht eine halbe Einheit Standard Insulin unter die lockere Rückenhaut gespritzt. Die Tiere der zweiten Gruppe bekamen eine Dosis des unbekannten Insulins, von dem angenommen wurde, daß es etwa so wirksam wie eine halbe Einheit sei. Sowohl vor der Einspritzung als auch fünfmal im Abstand von einer Stunde hinterher wurden Blutproben genommen und der Blutzucker bestimmt.

Die äußeren Bedingungen vor und während der Versuche wurden für beide Kaninchengruppen möglichst gleich gestaltet. Einige Tage nach dem Vergleich der beiden Insuline, nachdem der Blutzuckerspiegel wieder längere Zeit normal war, wurde derselbe Versuch wiederholt und die Gruppen vertauscht. Wir erhielten bei den beiden Versuchen für die beiden Insuline jedesmal den gleichen Wirkungsgrad, es traten also keine individuellen Unterschiede bei den verschiedenen Kaninchen auf.

Aus dem Verhältnis der Einheiten des bekannten Insulins zu seinem Wirkungsgrad (Änderung des Blutzuckers pro Zeiteinheit) und dem Wirkungsgrad des unbekannten Insulins ließen sich dessen Einheiten errechnen.

Die Methode von Marks wurde nur teilweise angewandt, weil ich dabei ganz andere Ergebnisse erzielte, als zu erwarten war. Um die Ursachen der Widerstandsfähigkeit von Vögeln gegen Insulin erörtern zu können, wollte ich zunächst wissen, wieviel Insulineinheiten im Taubenpankreasextrakt enthalten sind. Die Ergebnisse der ersten Versuche wiesen mich jedoch in eine andere Richtung, was im folgenden gezeigt werden soll. Dabei wurden zehn Kaninchen verwendet, die, wie zuvor beschrieben, ausgewählt und behandelt wurden.

5) Die Herstellung der Rohkonzentration von Taubenpankreasextrakt

Schon vor der Entdeckung des Insulins im Jahre 1922 durch Banting und Best wurden aus der Bauchspeicheldrüse wirksame Extrakte hergestellt. Diese haben heute jedoch nur noch historisches Interesse.

Die Hauptpunkte, in denen sich die Arbeit der beiden Torontor Forscher von ihren Vorgängern unterscheiden, sind:

1. die Erkenntnis, daß das Insulin ein relativ labiler Stoff ist, der durch die Fermente der äußeren Pankreassekretion, besonders durch Trypsin zerstört wird und am besten in saurer alkoholischer Lösung extrahiert wird;
2. die Reinigung der Extrakte von Eiweiß;
3. die Anwendung einer einwandfreien Testmethode nach den verschiedenen Reinigungsphasen (Bomskov 1937).

Das Insulin kann aus dem Pankreas durch Säuren und auch durch Äthylalkohol herausgelöst werden. Dabei galt es zunächst, die Bedingungen zu überprüfen, unter denen aus einer geringen Pankreasmenge möglichst viel Insulin gewonnen werden kann.

Zuerst wurde die Methode von Dodds und Dickens 1924 in Betracht gezogen, doch schied sie sehr bald aus, da hierfür eine Pankreasmenge von mindestens 1000 Tauben nötig ist und außerdem eine große Menge absoluten Alkohols.

Die Methode von Jephcott (1931), die mir der Direktor der Firma "Hormonchemie" in Freimann empfahl, wurde vorgezogen, denn sie versprach mit einer kleinen Pankreasmenge gute Ergebnisse und konnte mit den bereits vorhandenen 60 Tauben durchgeführt werden. Sie wurde zunächst zur Herstellung von Kalbsinsulin ausprobiert.

Tabelle A

Der Einfluß von dem bekannten Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen

Nummer des Tieres	Gewicht kg	Ge- schlecht	Nummer der Anal. Proben	Normalblut- zucker mg/ 100 ccm Bl.	Zeit pro Stunde					
					1	2	3	4	5	6
1	2,85	♀	5	99	65	80	83	88	92	98
2	2,15	♀	5	103	66	82	87	93	98	102
3	3,15	♂	5	89	56	72	73	80	85	88
4	3,05	♂	5	101	60	77	79	90	99	100
5	2,85	♂	5	90	53	67	76	78	87	90
Durchschnittswerte:					60	75,6	79,6	85,8	92,2	95,6

Tabelle B

Der Einfluß von dem unbekannten Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen

Nummer des Tieres	Gewicht kg	Ge- schlecht	Nummer d. Anal. Proben	Normalblut- zucker mg/ 100 ccm Bl.	Zeit pro Stunde					
					1	2	3	4	5	6
1	2,85	♀	5	94	73	82	86	92	95	95
2	2,15	♀	5	99	77	87	89	95	99	99
3	3,15	♂	5	84	69	80	84	83	85	85
4	3,08	♂	5	100	76	84	88	93	99	101
5	2,85	♂	5	88	65	78	83	86	88	88
Durchschnittswerte:					72	82,2	86	89,8	93,2	93,6

Aus 30 g Kalbspankreas, den ich freundlicherweise von der vorgenannten Firma bekam, wurde Insulin hergestellt, dessen Wirkungsweise bei gleichen Bedingungen mit dem von der Firma erzeugten Insulin verglichen wurde (siehe Tabelle A und B S.14). Seine Wirkung war etwas schwächer als die aus der Ampulle der Firma, im ganzen bewährte sich jedoch die Herstellung aus kleinen Mengen nach Jephcott, die ich bei meinen Tauben verwenden wollte.

Ich habe sie mit Hilfe der genannten Firma weiterentwickelt, so daß mit wenig Pankreas genug Insulin gewonnen wurde.

- 1) Von den 60 Tauben wurden 50-60 g Pankreas gewonnen. Gleich nach dem Tode wurden zu je 25 g Pankreas 75 ccm abs.Alkohol hinzugefügt, dem 1,5 ccm konz.Salzsäure beigemischt waren. Da die Drüsen bereits Wasser enthielten, brauchte keines mehr von außen zugegeben werden. Der Alkohol wäre sonst zu sehr verdünnt worden, und wir hätten keinen ganz reinen Extrakt bekommen.
- 2) Die obige Mischung wurde in einer Reibschale mit weißem, gewaschenem und getrocknetem Sand eine Stunde lang alle 10 Minuten gerieben. Damit sich möglichst wenig Alkohol verflüchtigte, wurde die Schale mit einer Glasplatte bedeckt.
- 3) Anschließend wurde der Extrakt 10 Minuten lang zentrifugiert.
- 4) Die Flüssigkeit wurde abgegossen und der Niederschlag mit 75 ccm abs.Alkohol, 25 ccm Wasser und 0,5 ccm konz.Salzsäure versetzt. Das Wasser wurde hinzugefügt, da dem Niederschlag durch den abgegossenen Alkohol nahezu alles Wasser entzogen worden war. Ein wäßriges Medium sollte jedoch vorhanden sein, denn Insulin ist wasserlöslich. Durch das Ansäuern wird

die Wirkung des Trypsins aufgehoben. Es wurden nur 0,5 ccm HCl zugegeben, weil beim erstenmal bereits der größere Teil der Salzsäure hinzugefügt worden war. Nun wurde der Niederschlag ebenfalls eine Stunde lang alle 10 Minuten mit Sand gerieben und anschließend 10 Minuten zentrifugiert.

- 5) Der Abguß von der zweiten Zentrifuge wurde zum ersten Abguß hinzugegeben. Der pH war nahezu 2, die Lösung also sauer.
- 6) Nun wurde 25%iger Ammoniak hinzugefügt bis pH 8 erreicht wurde. Hierbei fiel ein Niederschlag aus. Et wurde abgetrennt, nachdem das Ganze 10 Minuten lang zentrifugiert worden war.
- 7) Die dekantierte Lösung wurde nun bis zum pH 3 mit 2n Salzsäure versetzt (9 ccm konz.HCl in 50 ccm Wasser).
- 8) Die Lösung wurde in einem Rundkolben eingedampft und gleichzeitig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dabei wurde solange Alkohol entzogen, bis $\frac{1}{5}$ des Ausgangsvolumens erreicht war. Das neue Volumen wurde mit destilliertem Wasser verdoppelt und das Ganze daraufhin wiederum um die Hälfte vermindert. Damit war die Lösung vollkommen alkoholfrei.
- 9) Inzwischen hatten sich Fett-Tröpfchen am Rande des Kolbens angesammelt. Darauf wurde Äther zugegeben und zentrifugiert.
- 10) In den Zentrifugenrührchen konnten drei Schichten unterschieden werden. Die erste braune bestand aus Fett und Äther, die zweite aus Protein, bildete einen Ring, und die dritte Schicht, die mit einer Pipette abgesaugt wurde, war flüssiger Extrakt.
- 11) Der Extrakt wurde ausgesalzen (für 100 g Pankreas 25 g Natriumchlorid) und dann zentrifugiert. Am

oberen Ende des Zentrifugenröhrchens bildete sich ein Ring aus Salz und Insulin. Die restliche Lösung wurde als Glucagon bestimmt.

- 12) Das ausgesalzene Insulin wurde nun in destilliertem Wasser gelöst. Dabei trat eine Trübung auf, die durch Filtrieren mit Spezialfiltrierpapier "Seitz Kreuznach KO 5" beseitigt wurde.

Um es länger frisch zu halten, wurden 0,3 % Phenol hinzugegeben und das Ganze in dem Kühlschrank bei -4°C aufbewahrt.

- 13) Das Glucogen wurde unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt.

Bemerkungen:

zu 8): Beim Eindampfen der Insulin- und Glucagomlösungen dürfen 40°C nicht überschritten werden. Der Schaum, der beim Eindampfen auftrat, konnte durch Zugabe von wenigen Tropfen Octylalkohol beseitigt werden.

zu 12): Das benützte Phenol mit einem pH von 2,5 war nahezu 90%ig.

Während der Herstellung des Insulins wurden keine Metallbehälter verwendet, da Insulin mit allen Metallen, außer Vanadium und Nickel, leicht Verbindungen eingeht.

Die gewonnene Insulinmenge war sehr klein. Was überhaupt in nennenswerter Weise gewonnen wurde, war das Glucagon.

B. Ergebnisse

1) Der Einfluß von Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen

Die Rolle der Langerhans'schen Inseln bei der Regulierung des Blutzuckers der Säugetiere ist Gegenstand einer großen Zahl von Untersuchungen gewesen. Bei den klassischen Versuchen von Mering und Minkowsky (1889) führte die vollständige Entfernung des Pankreas zu schwerer Zuckerkrankheit. Diese Entdeckung führte zu weiteren Arbeiten über die Bedeutung dieses Organs für die Blutzuckerregulierung und es wurde immer augenscheinlicher, daß die innere Sekretion der Langerhans'schen Inseln für die Beziehung zwischen Pankreas und Kohlenhydratstoffwechsel verantwortlich zu machen ist. Der wichtigste indirekte Beweis für diese Ansicht von Macleod aus dem Jahre 1922 wurde durch krankhafte Veränderungen in den Inselzellen erbracht, die während der Zuckerkrankheit auftraten. Die Rückbildung der Pankreaszellen selbst erfolgte wie experimentell nachgewiesen, durch Unterbrechung des ductus pankreaticus. Ein weiterer indirekter Beweis wurde von Banting und Best 1922 in Macleods Laboratorium geführt. Ihnen gelang es als ersten von einem rückgebildeten Säugerpankreas, dessen Pankreaszellen verkümmert, dessen Inselzellen jedoch noch intakt waren, einen Auszug herzustellen, der bei zuckerkranken Hunden den hohen Blutzuckerspiegel auf das normale Maß herabsetzte. Schon bald darauf konnte ein Wirkstoff aus den Inselzellen eines normalen Pankreas hergestellt werden, und er wurde nach ihnen - Insulin - genannt. Seit der Entdeckung des Insulins ist die Wirkung auf den Blutzucker verschiedener Säugetiere bei Einspritzungen dieses Hormons sehr eingehend untersucht worden.

Bei den verschiedenen Säugerformen war die Wirkung sehr verschieden: einige bekamen selbst bei großen Dosen nur eine leichte Hypoglykämie ohne Verkrampfungerscheinungen, oder es traten andere Symptome auf, andere dagegen zeigten schon nach kleinen Insulinmengen einen wesentlich herabgesetzten Blutzuckergehalt, und tödliche Dosis war ebenfalls gering.

Gleiche Unterschiede bezüglich der Widerstandsfähigkeit gibt es zwischen den Formen der anderen Wirbeltierklassen (Beutler 1939). Im ganzen gesehen sind Vögel und Reptilien gegen eingespritztes Insulin nicht empfindlich. Nur große Dosen rufen Hypoglykämie hervor, die in besonderen Fällen von Krämpfen begleitet sein kann. Noble und Macleod stellten 1923 fest, daß Insulinispritzungen bei Schildkröten gar nicht wirksam sind.

Zuerst wurde die Wirkung des Kalbsinsulins bei Kaninchen erprobt. Das hier verwendete Insulin der Firma Hormonchemie enthielt 40 Einheiten pro ccm. Die Einheit wird definiert als die spezielle Wirkungsweise von $\frac{1}{22}$ mg des Normalmaßes, das vom Insulincommittee der Universität Toronto begründet wurde (Burn, Finney und Goodwin 1950). Der Schwellenwert des Insulins beim Kaninchen liegt zwischen $\frac{1}{10}$ und $\frac{2}{10}$ Einheit (Laquer und De Jough 1925).

Die verwendeten Kaninchen hatten 24 Stunden gehungert. Die Einspritzungen waren subcutan und intravenös.

Bei diesen Versuchen wurde den Kaninchen $\frac{1}{2}$ Einheit pro kg Körpergewicht eingespritzt, das ist eine Einheit für ein Kaninchen, das 2 kg wiegt. Die Dosis soll nicht größer sein, denn Marks stellte 1926 fest, daß bei mehr als 0,75 Einheiten pro kg die Wirkung des Insulins beim Kaninchen nicht mehr steigt. Dies war ein sehr wichtiges Ergebnis zur Messung unbekannter Insulinmengen.

Tabelle I

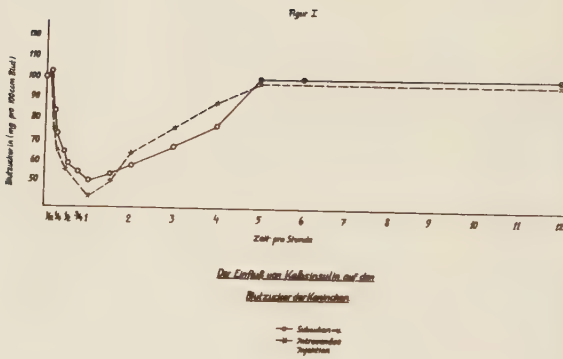
Der Einfluß von Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen (subcutan)

Num- mer des Tie- res	Ge- wicht kg	Ge- schlecht	Num-Normal- mer Blut- der zucker Anal.mg/100 Pro-ccm ben Blut	Z e i t i n M i n u t e n													
				5	10	15	25	30	45	60	90	120	180	240	300	720	
1	2,90	♀	5	120	107	98	89	83	80	78	80	82	90	102	119	120	
2	2,85	♀	6	117	121	92	84	76	74	70	73	76	84	97	116	117	
3	2,85	♂	4	90	92	72	60	54	47	42	44	50	56	78	90	90	
4	2,15	♀	5	99	102	84	71	62	54	50	48	55	56	62	99	99	
5	3,15	♂	3	102	103	87	76	67	60	53	57	62	67	91	101	102	
6	3,05	♂	5	88	90	70	62	51	48	43	40	48	54	77	88	88	
7	2,80	♀	6	106	110	90	78	69	64	60	57	60	66	82	96	106	
8	2,50	♂	4	86	87	66	58	49	43	40	35	39	44	53	73	86	
9	2,85	♀	3	101	104	84	76	69	63	60	55	60	64	72	94	101	
10	3,15	♀	4	98	100	82	70	61	52	51	46	49	56	70	86	98	
Durchschnittswerte				45	103,3	84,4	74,1	65,5	59,3	56,5	52,4	56,5	60,6	69,0	77,8	100,4	100,7

Tabelle 2

Der Einfluß von Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Kaninchen (intravenös)

Num- mer des Tie- res	Ge- wicht kg	Ge- schlecht	Num- mer der Blut- zucker Anal.mg/100 Pro- ccm Bl. ben	Z e i t i n M i n u t e n												
				5	10	15	25	30	45	60	90	120	180	240	300	720
1	2,90	♀	4	124	100	93	85	82	80	74	76	90	98	107	124	123
2	2,85	♀	5	112	91	79	71	63	60	59	69	86	94	102	111	111
3	2,85	♂	5	90	69	58	50	47	40	36	40	59	67	81	90	90
4	2,15	♀	5	100	77	66	56	47	43	40	48	57	70	83	99	99
5	3,15	♂	4	106	87	72	64	66	60	52	56	68	82	97	106	106
6	3,05	♂	5	87	60	51	42	39	35	37	40	52	68	79	85	86
7	2,80	♀	4	104	80	70	65	63	55	50	58	69	74	95	102	102
8	2,50	♂	4	87	60	53	41	44	40	40	42	56	69	77	86	86
9	2,85	♀	4	100	78	67	59	46	45	46	49	63	75	89	99	99
10	3,15	♀	5	100	74	61	51	40	40	41	46	60	71	81	96	96
Durchschnittswerte:				101,1	77,6	58,4	53,7	49,8	45,3	54,5	66,0	76,8	91,9	87,1	99,7	99,8



In Tabelle 1 und 2 (S.20,21) sind die Ergebnisse der Insulinwirkung auf den Blutzuckerspiegel der Kaninchen dargestellt. Sie sind Durchschnittswerte aus 45 Blutzuckerbestimmungen von 10 Kaninchen, die jeweils für die einzelnen Zeitabschnitte nach der Injektion ermittelt wurden. Sie liegen der Blutzuckerkurve von Figur 1 (S.22a) zugrunde.

Obwohl die Ampulle Insulin, die ich von der Firma bekam, als glucagonfrei bezeichnet wurde, beobachtete ich in den ersten 5 Minuten nach der Einspritzung ein Ansteigen des Blutzuckergehalts, was Glucagonspuren verriet, die dem reinen Insulin beigegeben waren. Dieses Ergebnis stimmte mit dem von Collip 1923, Bürger und Kramer 1929, 1930, Bürger 1949, Sutherland, Cori, Hayens und Olsen 1949, Weitzel und Mitarbeitern 1953, Schmitz 1958, überein. Die Zunahme betrug nahezu 4 mg pro 100 ccm Blut. Der normale Blutzuckergehalt vor der Injektion, d.h. der Durchschnittswert lag bei 100,7 mg pro 100 ccm Blut. 5 Minuten nach der subcutanen Einspritzung betrug der Zuckergehalt 103,3 mg pro 100 ccm Blut. Nach dem Anstieg begann mit dem Absinken des Blutzuckerspiegels der Einfluß des Insulins erst wirksam zu werden. 10 Minuten nach der Injektion war die Zuckermenge auf 84,4 mg/100 ccm Blut gesunken. Nach 15 Minuten betrug sie nur noch 74,1 mg und nach 25 Minuten noch 65,5 mg. Nach einer halben Stunde betrug die Zuckermenge nur noch 59,3 mg/100 ccm Blut, nach 45 Minuten war dieser Wert jedoch nur wenig geringer. Eine Stunde nach der Einspritzung betrug die Zuckermenge noch nahezu die Hälfte des Normalwertes, nämlich 52,4 mg pro 100 ccm Blut. Nun begann der Zuckergehalt wieder zu steigen. Nach 1½ Stunden wurden 56,5 mg gemessen, nach 2 Stunden 60,6 mg, nach 3 Stunden 69 mg und nach 4 Stunden 77,8 mg. Nach 5 Stunden war der Blutzuckergehalt mit 100,4 mg wieder normal, was sich auch nicht mehr änderte, wie eine Messung nach 12 Stunden festgestellt hat. Das Verhalten der Tiere war ganz normal. Es wurden nie Gleichgewichtsstörungen noch Verkrampfungen oder ähnliche Anzeichen festgestellt.

Die Wirkung der intravenösen und der subcutanen Einspritzung war nahezu gleich groß, nur stellte sie sich bei intravenösen Injektionen schneller ein.

2) Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Kaninchen

Die bisher veröffentlichten Angaben (Sutherland und De Duve 1948, Audy und Kerly 1952, De Duve und Vuylsteke (1953) machen die Existenz eines Hormons in den Bauchspeicheldrüsen bzw. den Inselorganen fötaler und erwachsener Rinder, Kaninchen, Hunde, Katzen, Ratten, Meerschweinchen, Frettchen, Enten, Seeteufel und Thunfische sehr wahrscheinlich (Holt 1955). Murlin und Kimball bezeichneten es 1923 als Glucagon, Sutherland und De Duve als hyperglykämisch-glycogenolytischen Faktor, gebildet wird es in den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln (Gaede, Ferner und Kastrup 1950). Bürger hat 1929 die Wirkung dieses Hormons untersucht.

1956 berichteten Weitzel, Buddecke und Kraft über die Blutzuckerwirkung von Pankreasextrakten des Huhns, wobei mit besonderer Regelmäßigkeit stark ausgeprägte Glucagon-effekte auftraten. Außerdem stellten sie fest, daß die Blutzuckerwirkung von Extrakten des Gesamtpankreas der Ente einen erheblich höheren Glucagongehalt im Vergleich zu Pankreasextrakten von Säugetieren erkennen läßt, jedoch einen etwas schwächeren Insulingehalt. Vuylsteke und De Duve schätzen 1953, daß Pankreasextrakte verschiedener Vögel "etwa zehnmal mehr Glucagon" als diejenigen von Säugetier-Pankreas enthalten.

Der folgende Versuch, bei dem Taubenpankreasextrakt an Kaninchen erprobt wurde, lieferte ein ganz gleichartiges Ergebnis, wie es Weitzel und seine Mitarbeiter bei der Ente erhalten hatten: der Gehalt an Glucagon ist im Taubenpankreasextrakt im Vergleich mit Pankreasextrakten der Säugetiere erheblich höher, der Insulingehalt dagegen etwas niedriger.

Tabelle 3

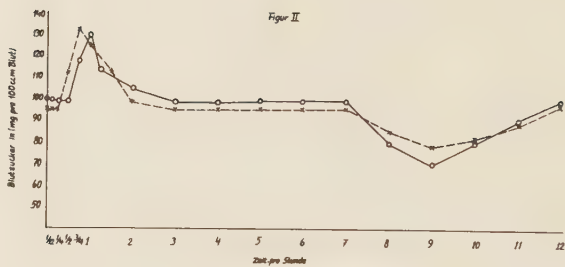
Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Kaninchen (subcutan)

Num- mer des Tie- res	Ge- wicht kg	Ge- schlecht	Num- mer Blut- zu.	Pro- cent/ 100 ben Blut	Z e i t												St u n d e					
					1/2	1/4	1/2	3/4	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12
1	2,90	♀	4	84	84	83	84	120	113	101	86	83	83	83	86	89	75	68	70	76	83	84
2	2,85	♀	3	128	128	127	140	153	135	129	126	126	128	128	128	130	103	94	102	110	128	128
3	2,85	♂	3	95	95	95	110	125	107	100	97	97	99	99	95	95	70	63	73	83	95	95
4	2,15	♀	4	103	103	102	104	112	134	121	109	104	104	104	103	80	72	86	96	102	102	103
5	3,15	♂	2	107	107	108	107	117	140	125	114	109	107	107	108	107	86	75	91	104	106	107
6	3,05	♂	4	87	87	87	87	125	117	106	90	88	87	87	87	88	75	65	70	78	87	87
7	2,80	♀	3	107	107	105	104	119	138	125	111	107	107	108	108	107	89	76	92	105	107	107
8	2,50	♂	3	97	97	97	96	113	130	110	104	96	97	97	97	97	76	66	80	87	96	97
9	2,25	♀	2	99	97	99	97	115	130	107	106	93	97	95	99	99	80	69	75	88	97	97
10	3,15	♀	2	95	95	95	96	112	123	109	102	95	91	95	95	94	73	65	72	84	95	95
Durchschnittswert.					30	100,2	100,0	99,7	130,3	105,1	99,6	100,6	80,7	81,1	99,6	100,3	100,9	71,3	91,1	100,0	100,0	100,0
						99,9	118,3	114,6	99,8	99,8	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3	100,3

Tabelle 4

Der Einfluß des Taubenpankreasextrakt auf den Blutzucker der Kaninchen (intravenös)

Num- mer des Tie- res	Ge- schlecht	Num- mer der Ge- samt schlecht-Anal- ysen	Norm. Blut. zu. mg/100 cm/Bl.	Z e i t p r o S t u n d e																	
				1/12	1/4	1/2	3/4	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	24
1	2,90	♀	84	84	83	105	125	120	108	90	86	80	80	83	81	70	64	70	76	84	84
2	2,85	♀	110	111	110	130	150	145	132	111	107	110	110	110	110	110	90	93	105	110	110
3	2,85	♂	97	97	97	114	131	124	112	99	99	97	97	97	97	98	88	80	85	94	97
4	2,15	♀	107	108	107	125	144	140	125	113	109	107	107	108	108	103	100	100	106	107	107
5	3,15	♂	99	99	99	115	134	127	116	102	98	97	98	99	99	91	80	87	96	99	99
6	3,05	♂	88	88	88	107	129	123	111	92	90	91	90	88	90	73	70	72	85	88	88
7	2,80	♀	103	102	102	120	141	135	119	109	102	101	104	104	104	101	92	96	100	102	103
8	2,50	♂	90	90	90	103	125	114	104	90	92	92	92	90	90	83	80	80	88	89	90
9	2,85	♀	92	92	92	103	122	112	107	94	94	93	93	92	91	86	80	82	91	92	92
10	3,15	♀	89	89	89	109	133	125	112	90	92	92	88	89	89	77	70	79	87	88	89
Durchschnittswerte 30				95,9	95,9	113,1	126,6	99,0	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	95,9	96,1	86,2	83,8	80,6	83,8	91,8	96,6
				95,9	95,9	133,4	114,6	99,0	96,9	96,9	96,9	96,9	95,9	96,1	80,6	83,8	80,6	83,8	91,8	96,6	96,9



Der Einfluss von Tauschepersonenverteilung
auf den Blutzucker der Kienrichen

—●— Subcutan-Injektion
 - - - - - Intravenöse Injektion

Der nach der Methode von Jephcott 1931 hergestellte Taubenpankreasextrakt wurde subcutan und intravenös 24 Stunden hungernden Kaninchen eingespritzt. Die eingespritzte Menge betrug 1 ccm Pankreasextrakt pro kg Körpergewicht (siehe Tabelle 3 und 4, S.24/25, sowie Figur 2 S.26a).

Aus dreißig analysierten Proben ergab sich vor der Injektion ein durchschnittlicher Normalwert von 100,2 mg Zucker pro 100 ccm Blut. Weder fünf Minuten nach der Injektion noch nach einer Viertelstunde, noch nach einer halben Stunde änderte sich der Blutzuckerspiegel, wie Tabelle 3 zeigt. Nach dreiviertel Stunden war dagegen ein Blutzuckeranstieg (Hyperglykämie) auf 118,3 mg Zucker pro 100 ccm Blut zu erkennen, und nach einer Stunde 130,3 mg pro 100 ccm Blut festzustellen. Der Blutzuckerspiegel hatte also in einer Stunde um 30 mg/100 ccm Blut zugenommen.

Eineinhalb Stunden nach der Injektion betrug der Blutzuckergehalt nur noch 114,6 mg und nach zwei Stunden nur noch 105,1 mg pro 100 ccm Blut.

Der Blutzuckerspiegel nahm nach drei Stunden wieder den Normalwert an und er blieb auch nach weiteren vier Stunden, d.h. sieben Stunden nach der Injektion, noch unverändert.

Die Blutzuckersteigerung (Hyperglykämie) beruht auf dem Glucagon, das auch als hyperglykämisch-glycogenolytischer Faktor bezeichnet wird.

Das Insulin des Taubenpankreasextrakts begann erst acht Stunden nach der Einspritzung auf den Blutzucker der Kaninchen zu wirken. Der Blutzuckerspiegel betrug nun 80,7 mg/100 ccm Blut. Nach neun Stunden sank der Gehalt auf 71,3 mg und damit um 30 mg/100 ccm Blut vom Normalwert. Man kann beobachten, daß die Abnahme an Blutzucker (Hypoglykämie) = 30 mg pro 100 ccm Blut neun Stunden nach der Injektion etwa gleich der Zunahme des Blutzuckers

(Hyperglykämie) = 30 mg/100 ccm Blut nach einer Stunde entspricht.

Nach zehn Stunden betrug der Blutzucker wieder 81,1 mg % und nach 11 Stunden 81,1 mg/%. Der Normalwert wurde 12 Stunden nach der Injektion wieder erreicht und war auch nach 24 Stunden noch unverändert.

Während der Versuche wurden die Kaninchen regelmässig beobachtet. Es zeigten sich keine Krämpfe.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich der bereits am Anfang des Versuches vorweggenommene Schluß ziehen, daß Taubenpankreasextrakt einen erheblich höheren Glucagongehalt und einen etwas geringeren Insulingehalt besitzt. Die Wirkung intravenöser Injektion war ungefähr gleich der von subcutanen.

Die Senkung des Blutzuckers 8 Stunden nach der Injektion ist nicht auf Hunger zurückzuführen, denn auch bei 48 Stunden hungernden Kaninchen, die sonst unbeeinflusst waren, blieb der Blutzuckerspiegel normal.

Auch das Material, das zur Herstellung des Taubenpankreasextrakts benutzt wurde, wie Alkohol, Phenol und aqua dest. hatte nach Einspritzung auf den Blutzucker der Kaninchen keinen Einfluß. Die Senkung erfolgte also durch das Insulin.

3) Der Einfluß von insulinfreiem Taubenglucagon auf den Blutzucker der Kaninchen

Schon bald nach der Entdeckung des Insulins wurde auf eine merkwürdige Erscheinung hingewiesen, die nach der Intravenösen Einspritzung von Insulin auftrat. Vor der eigentlichen Insulinhypoglykämie war regelmäßig eine leichte Blutzuckersteigerung zu beobachten (Murlin und Kimball 1923). Mit diesem zunächst als "paradoxe Insulinwirkung" bezeichneten Phänomen haben sich in zahlreichen Arbeiten eingehend Bürger und seine Mitarbeiter in den Jahren 1929, 1930 und 1947 beschäftigt.

In den Jahren 1929 und 1930 wies Bürger nach, daß diese Wirkung durch Abbau des Leberglycogens zustande kommt und prägte zusammen mit Murlin den Namen "Glucagon".

Gaede, Ferner und Kastrup entdeckten 1950, daß das Glucagon in den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln gebildet wird.

Nach Bromer, Sinn und Behrens 1957 ist Glucagon ein Polypeptid mit 29 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von mindestens 3482. Es enthält im Gegensatz zum Insulin Tryptophan und Methionin, aber kein Prolin, Isoleucin oder Cystein. Quantitative Bestimmungen ließen erkennen, daß das Methionin für den gesamten Schwefelgehalt in kristallinem Glucagon verantwortlich ist. Dadurch wird die Tatsache gefestigt, daß keine andere schwefelhaltige Aminosäure vorhanden ist (Staub, Sinn und Behrens 1955). Das Fehlen von Cystein erklärt wahrscheinlich den relativ großen Widerstand des Glucagons gegen die Behandlung mit Alkalien - eine Eigenschaft, die zur Gewinnung insulinfreier Glucagonlösungen benutzt wurde (Bürger und Brandt 1935, Sutherland und Cori 1948).

Mohnike und Boser berichteten 1953 beim Rind und Kalb von der Herstellung eines kristallinen HGF (hyperglykämisch-glycogenolytischen Faktors). Er scheint ein Globoproteid zu sein und unterscheidet sich merklich von dem kristallinen Glucagon, das Staub und seine Mitarbeiter 1955 beschrieben haben. Dieses enthält Methionin und Threonin, zwei Aminosäuren, die in Glucoproteiden nicht vorkommen. Andererseits fehlen dem Glucagon Isoleucin und Prolin, zwei Bestandteile des von Mohnike und Boser hergestellten Stoffs. Das Glucagon ist frei von Kohlenhydraten und hat alle Eigenschaften eines einfachen Proteins.

Bürger gelang es 1949, die Wirkung des Glucagons von der des Insulins zu trennen. Diese Trennung erfolgt auf verhältnismäßig einfache Weise durch halbstündiges Erhitzen von glucagonhaltigen Insulinpräparaten mit 1/200-n

Sodalösung auf 96°C . Hierdurch wird das Insulin inaktiviert, das Glucagon dagegen behält seine Wirkung.

Ebenso läßt sich Insulin durch Cystein inaktivieren (Du Vigneud und Mitarb. 1931). Merkwürdigerweise wird das Glucagon unter den Bedingungen, unter denen das Insulin vom Cystein inaktiviert wird, nicht aktiviert. Das ist auffällig, weil stark angereicherte Glucagonpräparate ebenso wie das Insulin Schwefel enthalten, und man deshalb annehmen sollte, daß das Glucagon, ebenso wie man das vom Insulin annimmt, eine S-Gruppe im Molekül enthält, die durch die SH-SH Gruppe des Cysteins reduziert wird. Dieser Übergang, so glaubt man, verursacht die physiologische Inaktivierung des Insulins.

Auch die Inaktivierung des Taubeninsulins wurde mit $1/200$ n-Sodalösung durchgeführt. Das gewonnene Glucagon reagierte mit dem Biuret-Test und Millens Reagens positiv. Beides sind Probereaktionen auf Eiweiß. Die Trommer'sche Probe und der Fehling'sche Test auf Zucker fielen dagegen negativ aus, d.h. es ist kein Zucker im Glucagon enthalten, es ist also kein Glukoproteid, wie Mohnike und Boser 1953 festgestellt haben. Das Glucagon habe ich dem Kanonchen intravenös und subcutan eingespritzt. Die eingespritzte Menge betrug 1 ccm pro kg Körpergewicht. Die Tiere waren vor den Versuchen 24 Stunden lang nüchtern.

Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 5 und 6 (S.30/31). Danach wurde Figur 3 (S.32a) gezeichnet. Aus Tabelle 5 kann man ersehen, daß der Ausgangswert des Blutzuckerspiegels von 26 analysierten Proben im Durchschnitt 99,4 mg pro 100 ccm Blut betrug. Fünf Minuten nach der Einspritzung nahm der Blutzucker auf 105,6 mg/100 ccm Blut zu, d.h. es trat Hyperglykämie ein. Nach einer Viertelstunde hatte er 116,7 mg pro 100 ccm Blut erreicht. Eine halbe Stunde nach der Einspritzung war der Blutzuckergehalt auf 124,5 mg/100 ccm Blut gestiegen und lag damit um 25,1 mg pro 100 ccm Blut über dem Ausgangswert.

Tabelle 5

Der Einfluß von insulinfreiem Taubengluccagon auf den Blutzucker der Kaninchen (subcutan)

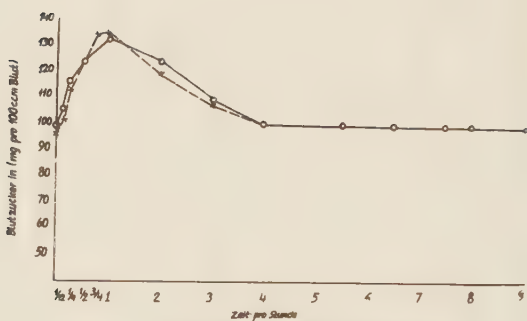
Num- mer des Tie- res	Ge- wicht- kg	Ge- schlecht	Num- mer der Anal.	Norm. Blut- zu.mg/100ccm Pro-Blut ben	Z e i t										S t u n d e			
					1/4	1/2	1	2	3	4	6	7	8	9				
1	2,90	♀	3	90	96	104	117	126	118	107	95	90	90	91				
2	2,85	♀	3	118	125	133	140	148	138	123	120	118	118	119				
3	2,85	♂	3	100	107	119	124	130	118	103	100	100	101	100				
4	2,15	♀	2	103	111	122	130	135	123	108	102	103	103	103				
5	3,15	♂	2	110	119	125	137	140	128	115	109	110	110	110				
6	3,05	♂	2	91	96	110	117	128	120	107	90	91	91	89				
7	2,80	♀	2	101	108	115	122	131	119	104	104	101	102	102				
8	2,50	♂	3	97	100	118	123	130	126	108	93	95	97	98				
9	2,85	♀	3	89	94	106	115	122	120	110	96	88	90	89				
10	3,15	♀	3	95	100	115	120	135	122	110	95	95	95	97				
Durchschnittswerte				26	99,4	105,6	116,7	124,5	132,5	123,2	109,5	100,4	99,1	99,7	99,4	99,8		

Tabelle 6

Der Einfluß von insulinfreiem Taubenglucagon auf den Blutzucker der Kaninchen (intravenös)

Num- mer des Tie- res	Ge- wicht- kg	Ge- schlecht	Num- mer der Anal. ccm Pro- Blut ben	Z e i t p r o s t u n d e													
				1/12	1/4	1/2	3/4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	2,90	♀	3	96	100	110	124	132	130	118	107	100	96	96	97	96	97
2	2,85	♀	3	106	112	125	135	143	140	127	120	109	106	106	107	107	108
3	2,85	♂	3	89	95	108	120	129	129	112	101	94	90	90	90	89	89
4	2,15	♀	3	99	104	118	127	138	137	125	112	101	101	99	99	99	100
5	3,15	♂	3	93	102	105	121	130	130	113	101	97	95	93	93	93	95
Durchschnittswerte				15	96,6	102,6	113,2	125,4	134,4	133,2	119,0	108,2	97,6	96,8	97,2	97,8	97,8

Figur III



Der Einfluß von insulinfreiem Tauschglucose
auf den Blutzucker der Kaninchen

Nach einer Stunde wurde der höchste Blutzuckergehalt erreicht, der 33 mg über dem Normalwert lag. Diese Zunahme stimmte mit der von Bürger und Brandt 1935, Staub und seinen Mitarbeitern 1955 und Schmitz 1958 überein, die den Kaninchen Kalbsglucagon eingespritzt hatten.

Zwei Stunden nach der Injektion war der Blutzuckerspiegel wieder abgesunken, er betrug nur noch 123,2 mg pro 100 ccm Blut. Nach drei Stunden waren es noch 109,5 mg/100 ccm Blut.

Der Normalwert wurde erst vier Stunden nach der Einspritzung wieder erreicht. Bis acht und neun Stunden nach der Injektion war kein Einfluß von Insulin festzustellen, es trat also keine Hypoglykämie auf, wie das nach eingespritztem Taubenpankreasextrakt der Fall war.

Die für Tabelle 6 gewonnenen Daten sind ungefähr die gleichen wie für Tabelle 5, nur daß die intravenösen Injektionen etwas schneller wirkten (Bürger 1949, Staub, Sinn und Behrens 1955). Es traten keine Krämpfe oder Zuckungen während der Versuche auf. Die Kaninchen verhielten sich ganz normal.

4) Normal-Blutzucker der Tauben und Restreduktion

Alter, Geschlecht, Temperatur und Hunger haben keinen Einfluß auf den Blutzucker der Tauben (siehe Tabelle 7a, S. 53), der zwischen 172 und 209 mg pro 100 ccm Blut schwankt, was auch Erlenbach 1938 feststellte. Seine Werte für die Haustaube (*Columba domestica*) lagen zwischen 184 und 224 mg pro 100 ccm Blut.

Alter: Bei frisch gefangenen Tauben wurde der Blutzucker gemessen. Nach zwei Monaten wurde an den gleichen Tieren die Messung wiederholt. Es ergab sich jedoch keine Änderung.

Tabelle 7a

Der Einfluß von Alter, Geschlecht, Temperatur und Hunger auf den
Blutzucker der Tauben

Alter

Num- mer des Tie- res	Alter in Mona- ten	Ge- schlecht	Ge- wicht kg	Nummer der Anal. Proben	gehun- gert Stun- de	Normal- Blutzucker mg/100 ccm Blut
1	2	♂	0,23	6	24	178
1	3	♂	0,32	6	24	181
2	3	♂	0,29	5	24	189
2	4	♂	0,37	5	24	187

Geschlecht

1	3	♀	0,33	5	24	200
2	3	♂	0,30	5	24	196
1	4	♀	0,41	5	24	192
2	4	♂	0,40	5	24	194

Temperatur

Num- mer des Tie- res	Alter in Mona- ten	Tempe- ratur °C	Ge- schlecht	Ge- wicht kg	Ver- suchs- nummer	Normal- Blutzucker mg/100 ccm Blut
1	3	5	♀	0,33	5	187
1	5	15	♀	0,48	5	184
2	3	2	♂	0,29	5	179
2	4	23	♂	0,37	5	182

Hunger

Num- mer des Tie- res	Alter in Mona- ten	Ge- schlecht	Ge- wicht kg	Ver- suchs- nummer	gehunert Stunde	Normal-Blutzucker mg/100 ccm Blut	
						vor dem Hunger	nach dem Hunger
1	4	♂	0,41	5	10	201	200
2	3	♂	0,33	5	12	177	179
3	3	♂	0,32	5	24	195	196
4	3	♂	0,28	5	48	180	182

Tabelle 7b

Normal-Blutzucker und Rest-Reduktion von Tauben, die 24 Stunden vor dem Versuch gehungert haben

Nummer des Tieres	Gewicht kg	Ge- schlecht	Alter in Monaten	Versuchs- nummer	mg/100 ccm Blut		
					Gesamt- Blutzucker	Rest- Reduktion	vergärbare Zuckermenge
1	0,29	♀	3	5	190	40	150
2	0,35	♂	4	5	183	40	143
3	0,41	♂	4	5	201	45	156
4	0,33	♂	3	5	199	55	144
5	0,32	♀	3	5	178	45	133
Durchschnittswerte:					190,2	45	145,2

Geschlecht: Dann wurden zwei Tauben gleichen Alters, jedoch verschiedenen Geschlecht, ausgewählt, die einen etwa gleich hohen Blutzuckerspiegel hatten. Nachdem sie einen Monat unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten worden waren, wurde der Blutzuckerspiegel ein zweites Mal gemessen, ohne daß sich Unterschiede zeigten.

Temperatur: Nun wurde an besonders warmen Tagen im Sommer und besonders kalten Tagen im Winter der Blutzucker verschiedener Tauben gemessen. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede.

Hunger: Schließlich wurden mehrere Tauben zwischen zehn und 48 Stunden hungern gelassen. Es wurde jeweils vor und hinterher der Blutzucker gemessen, jedoch keine Unterschiede festgestellt.

Die Restreduktion bei 3 Tauben (siehe Tabelle 7b, S.33a) wurde nach der Methode von Koch und Hanke 1948 wie folgt gemessen:

Es wurde eine Hefesuspension angesetzt, um die Glucose zu vergären und die übrigen reduzierenden Nichtzuckeranteile freizusetzen, um sie messen zu können. Ziehen wir dann den Betrag der reduzierenden Nichtzuckeranteile vom Gesamtbetrag der reduzierenden Stoffe, die wie gewöhnlich gemessen wurden, ob, so bekommen wir den echten Blutzuckergehalt. Die Hefesuspension wurde ebenfalls nach obigen Autoren angesetzt. Dazu wurden 10 g feinst zerkleinerte Bäckerhefe in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst. Diese Hefeaufschlammung wurde 5 Minuten lang zentrifugiert und dann abgegossen. Das wurde noch dreimal wiederholt und dann die Hefe in 60 ccm aqua dest.aufgelöst. Sieben Teile der Lösung wurden mit einem Teil Blut vermenzt und etwa 15 Minuten bei 30°C aufbewahrt. Wie gewöhnlich wurde dann das Eiweiß entfernt und die reduzierenden Substanzen wurden bestimmt. Jeweils eine Gruppe von Blutproben wurde ver-

goren, ebenso wurde der Reduktionswert der benützten Hefesuspension allein bestimmt und von den Werten nach der Gärung abgezogen, um die Restreduktionswerte zu bekommen, d.h. die Menge der Stoffe im Blut zu ermitteln, die nicht mit Hefe vergärbar ist, aber auf andere Stoffe reduzierend wirkt.

Aus der obigen Methode ergab sich, daß von den reduzierenden Stoffen 35-55 mg %, durchschnittlich 45 mg % Nichtzuckeranteile sind, das sind etwa 33 % (siehe Tabelle 7b). Das Ergebnis stimmt mit Erlenbach 1938 überein.

5. Der Einfluß verschiedener Mengen Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Tauben

Wie bereits in der Einleitung auf Seite 3 erwähnt wurde, erweisen sich die Vögel als widerstandsfähig gegen Insulin, im besonderen die Tauben.

Während Hühner nach Markowitz 1925 schon hypoglykämische Symptome zeigten, wenn der Blutzucker auf 0,15 % gesunken ist, fand Zagami im Jahr 1927 bei verschiedenen Vogelarten ganz verschiedenes Verhalten. Weder Haustauben noch Hennen hatten bei 0,05 % Blutzucker (Normalwert 0,200 %) Krämpfe, Turteltauben zeigten solche bei 0,045%. 1945 fanden Chen, Anderson und Maze, daß hypoglykämische Krämpfe bei Tauben nach Einspritzung mit 400-1200 Insulin-einheiten pro kg Körpergewicht eintreten.

Die hier durchgeführten Versuche lieferten etwas andere Werte, Die dabei verwendeten Tauben wogen zwischen 0,29 und 0,33 kg. Sie hatten 24 Stunden vor den Versuchen gehungert. Das Blut wurde, wie auf Seite 8 beschrieben, durch Anstechen der Axillarvene entnommen. Derselben Taube konnte nicht mehr als fünfmal Blut entnommen werden, weil sie dann total erschöpft war. Nach jeder Entnahme blutete die Wunde mindestens noch 5-10 Minuten, da Vogel-

blut sehr wenig Thrombozyten enthält (Heinzler 1956).

Den Tauben wurden verschiedene Mengen Kalbsinsulin eingespritzt. Jede Ampulle von der Firma Hormonchemie in Freimann hergestellt, enthält 10 ccm Insulin mit je 40 Einheiten pro ccm.

Die Einspritzung erfolgte unter die Haut des Oberschenkels.

Die eingespritzten Mengen waren 1,5, 2, 3 und 7 ccm, und enthielten 60, 80, 120 und 280 Einheiten.

Tabelle 8 (Seite 37) und Figur 4 (S.38a) zeigen die Ergebnisse der Einspritzungen. Zunächst wurden Tauben mit 1,5 ccm Insulin gespritzt. Ihr Normalwert von 187 mg pro 100 ccm Blut, ein aus 12 Proben ermittelter Durchschnittswert, änderte sich in den folgenden fünf Stunden nicht.

Die Tauben waren normal und zeigten keine Krämpfe. Bei 2 ccm Insulin, d.h. 80 Einheiten, sank der Blutzucker innerhalb einer Stunde vom Normalwert (180,8 mg/100 ccm Blut) auf 147,5 mg ab und blieb dann eine Stunde unverändert.

Drei Stunden nach der Einspritzung war der Blutzuckergehalt jedoch wieder auf 157,5 mg/100 ccm Blut gestiegen und nach vier Stunden waren es bereits 170,8 mg.

Erst nach fünf Stunden wurde der Normalwert wieder erreicht. Auch dieses mal verhielten sich die Tauben normal und hatten keine Krämpfe, zeigten jedoch ungefähr einen Tag lang keine Lust zu fressen.

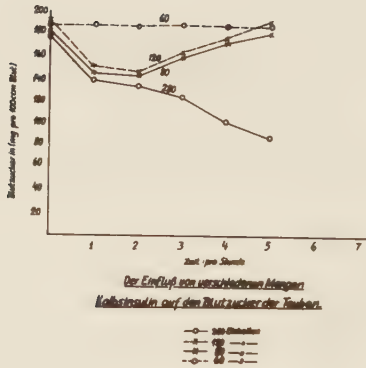
Bei den Tauben, die eine Spritze mit 3 ccm Insulin, also 120 Einheiten, bekamen, betrug der von 13 Proben genommene durchschnittliche Normalwert des Blutzuckerspiegels 192,3 mg pro 100 ccm Blut. Nach einer Stunde war der Blutzuckergehalt um 39 mg auf 150,3 mg % gesunken. Zwei Stunden später betrug er nur noch 145,5 mg/100 ccm Blut, nach drei Stunden war er jedoch schon wieder auf 162,5 und nach vier Stunden auf 176 mg % gestiegen. Nach fünf Stunden wurde der Normalwert wieder erreicht.

Tabelle 8

Der Einfluß von verschiedenen Mengen Kalbsinsulin auf den Blutzucker der Tauben

Nummer des Tieres	Ge- wicht kg	Ge- schlecht	Nummer d. Anal. Proben	Menge des Normalbl. Insulins zu mg/100		Zeit pro Stunde				
				in com	com Blut	1	2	3	4	5
1	0,33	♂	3	1,5	181	181	180	181	180	180
2	0,31	♂	2	1,5	178	176	173	178	177	177
3	0,29	♂	4	1,5	199	199	195	198	198	198
4	0,33	♂	3	1,5	193	196	194	193	193	195
Durchschnittswerte:				1,5	187,8	188	185	187,5	187	187,5
1	0,29	♂	2	2	180	155	162	163	170	180
2	0,30	♂	3	2	188	150	137	156	170	185
3	0,33	♂	3	2	175	135	123	149	170	175
4	0,29	♂	4	2	180	150	167	162	173	180
Durchschnittswerte:				2	180,8	147,5	147,5	157,5	170,8	180
1	0,31	♂	5	3	187	142	133	150	160	186
2	0,33	♂	5	3	203	160	150	171	189	200
3	0,31	♂	5	3	200	166	159	176	190	200
4	0,29	♂	4	3	179	133	140	153	165	179
Durchschnittswerte:				3	192,3	150,3	145,5	162,5	176	191,3
1	0,32	♂	4	7	178	138	138	129	100	89
2	0,29	♂	5	7	190	140	136	131	120	93
3	0,33	♂	5	7	177	135	132	122	95	90
4	0,33	♂	3	7	167	130	127	115	90	83
Durchschnittswerte:				7	178	135,8	132,2	126,8	101,3	88,8

Figur IV



Trotzdem starben alle Tauben 24 Stunden nach der Einspritzung.

Vier Tauben bekamen eine Spritze mit 280 Insulineinheiten. Bei ihnen war der durchschnittliche Normalwert aus 12 Proben 178 mg pro 100 ccm Blut. In der folgenden Stunde zeigte sich starke Hypoglykämie, d.h. der Blutzuckergehalt sank auf 135,8 mg % ab. Nach fünf Stunden betrug der Zuckergehalt nur noch 88,8 mg pro 100 ccm Blut. Dann konnten keine Blutzuckermessungen mehr vorgenommen werden, da die Tauben sehr erschöpft waren, so daß keine Blutentnahme mehr möglich war.

Nach 12 Stunden gingen alle Tiere ein.

60 Insulineinheiten hatten noch keinen Einfluß auf den Blutzucker der Tauben während 80 Einheiten schon eine Absenkung um 19% innerhalb einer Stunde bewirkten.

Bei 120 Einheiten war die Absenkung nach einer Stunde kaum größer, nämlich 21 %, auch sank der Blutzuckerspiegel absolut kaum tiefer als bei der Einwirkung von 80 Einheiten, nämlich auf 150,3 mg pro 100 ccm Blut, während er vorher auf 147,5 mg % gesunken war. Auch der Unterschied beim Anstieg nach drei Stunden auf 157,5 mg % bei 80 Einheiten, und 162,5 mg % bei 120 Insulineinheiten war nicht groß. Trotzdem gingen die mit 120 Einheiten gespritzten Tiere nach 24 Stunden ein.

Bei den mit 280 Einheiten gespritzten Tieren fiel der Blutzucker in einer Stunde um 27 %. Hier war die Insulinwirkung sehr stark, so daß das Sinken des Blutzuckerspiegels fünf Stunden anhielt und mangels Erschöpfung der Tiere nicht mehr verfolgt werden konnte. Bereits die Dosis von 280 Insulineinheiten ist aufs Körpergewicht umgerechnet 1680mal so stark wie die, die den Kaninchen gegeben wurde, wenn eine Taube mit 350 g angenommen wird. Die Kaninchen hatten eine halbe Insulineinheit

pro kg Körpergewicht bekommen. Das Ergebnis erklärt die Widerstandskraft der Tauben gegen Insulin (Honeywell 1921, Riddle 1922, Sordelle und Mitarbeiter 1923, Zagame 1927, Chen, Anderson und Maze 1945, Sturkie 1954). Das Verhalten der Tauben war so, wie es die Autoren beschrieben haben, jedoch mußte ich höhere Insulinmengen anwenden.

Vor dem Tod der Tiere traten Krämpfe auf.

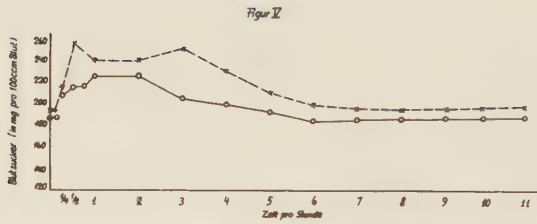
6. Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Tauben

Wie bereits Seite 23 erwähnt wurde, läßt die Blutzuckerwirkung von Extrakten des Pankreas der Ente einen erheblich höheren Glucagongehalt und einen etwas schwächeren Insulingehalt im Vergleich zu Pankreasextraktion von Säugetieren erkennen (Weitzel, Buddecke und Kraft 1956). Vuylstike und De Duve 1953 schätzen, daß die Pankreasextrakte verschiedener Vögel "etwa zehnmal mehr Glucagon" als diejenigen von Säugetieren enthalten.

Die hier beschriebenen Versuche verliefen folgendermaßen:

Es wurden fünf Tauben, die vor Versuchsbeginn 24 Stunden lang nüchtern gewesen waren, mit einem Körpergewicht zwischen 0,29 und 0,41 kg verwendet. Dazu wurden aus vorgenannten Gründen nur ♂♂ benutzt. Pro kg Körpergewicht wurde 1 ccm Taubenpankreasextrakt unter die Haut des Oberschenkels gespritzt.

Tabelle 9 und Figur 5 (S.40/40a) zeigen die Ergebnisse dieser Versuche. Aus 15 untersuchten Proben wurde ein durchschnittlicher Normalwert des Blutzuckers von 185 mg pro 100 ccm Blut gewonnen.



Der Einfluß von: 1. Tinkturenglykogen (---x---)
 2. Zuckerfreiem Tinkturenglykogen (—o—)
 auf den Blutzucker der Tauben.

Tabelle 9

Der Einfluß des Taubenpankreasextrakts auf den Blutzucker der Tauben (subcutan)

Num- mer des Tie- res	Ge- wicht kg	Ge- schlecht	Nummer der Anal. Proben	Normal- Blutzu. mg/100 ccm Blut	Z e i t p r o S t u n d e										
					1/12	1/4	1/2	3/4	1	2	3	4	5	6	7
1	0,40	0	3	197	199	218	228	230	243	242	226	217	210	201	198
2	0,39	0	3	160	163	163	183	191	192	200	201	193	184	178	164
3	0,41	0	3	178	180	200	205	207	210	212	195	190	181	177	178
4	0,29	0	3	189	190	205	213	219	222	223	202	194	190	189	188
5	0,33	0	3	201	203	219	223	230	231	230	211	202	201	200	202
Durchschnittswerte:			15	185	187	205	212	215,6	221,2	221,6	205,4	197,4	190	185,6	185
														186,2	185

Fünf Minuten nach der Einspritzung stieg der Blutzuckergehalt auf 187 mg %, nach einer Viertelstunde betrug er bereits 205 mg/100 ccm Blut und eine halbe Stunde später 212 mg %. Nach einer 3/4 Stunde war er auf 215,6 mg pro 100 ccm Blut gestiegen und eine Stunde nach der Einspritzung erreichte der Blutzuckergehalt mit 221,2 mg % seinen Höchstwert, der 36 mg über dem Normalwert lag. Er wurde auch eine Stunde später noch gemessen. Drei Stunden nach der Spritze war der Blutzuckergehalt wieder auf 205,4 mg pro 100 ccm Blut gesunken und vier Stunden später betrug er nur noch 197,4 mg %. Nach fünf Stunden waren es noch 190 mg % und sechs Stunden nach der Einspritzung wurde der Normalwert wieder erreicht, der sich in den folgenden fünf Stunden nicht mehr änderte.

Die Tauben zeigten keine Zuckungen oder Krämpfe, sondern verhielten sich alle normal und waren freßlustig.

Andere Mittel, wie Alkohol, aqua dest. und Phenal, die bei der Herstellung des Taubenpankreasextrakts verwendet wurden, hatten keinen Einfluß auf den Blutzuckergehalt. So blieb eine Mischung der drei Stoffe, die im gleichen Mengenverhältnis wie bei der Herstellung des Extrakts eingespritzt wurden, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen ohne Wirkung.

Auch 24- und 48-stündiges Hungern änderte den Blutzuckerspiegel nicht.

Der Taubenpankreasextrakt enthält nur sehr geringe Mengen Insulin, die nicht ausreichen, um acht Stunden nach der Injektion eine Blutzuckerhypoglykämie bei Tauben hervorzurufen, wie das bei Kaninchen der Fall ist. Auch das ist ein Beweis für die höhere Widerstandsfähigkeit der Tauben gegen Insulin.

7. Die Wirkung von insulinfreiem Taubenglucagon auf den Blutzucker der Tauben

Um das Insulin wirkungslos zu machen, wurde der Taubenpankreasextrakt eine halbe Stunde lang mit einer n/200-Sodalösung behandelt, wie es bereits auf Seite 29 beschrieben wurde. Die Tauben bekamen 24 Stunden vor dem Einspritzen kein Futter. Das Körpergewicht der verwendeten σ^7 lag zwischen 0,29 und 0,42 kg. Den Tieren wurde 1 ccm Extrakt pro kg Körpergewicht unter die Haut des Oberschenkels eingespritzt.

Aus Tabelle 10 und Figur 5 (S.43, 40a) ist die Wirkung des Extrakts auf den Blutzucker zu erkennen.

Aus 20 untersuchten Proben betrug der durchschnittliche Normalwert des Blutzuckers 190,4 mg pro 100 ccm Blut.

Fünf Minuten nach der Einspritzung waren es 192,6 mg % und nach einer Viertelstunde 212,2 mg/ 100 ccm Blut. Eine halbe Stunde danach erreichte der Zucker seinen höchsten Wert, nämlich 263,6 mg %. Dieser Wert übersteigt um 73 mg den Normalwert. Nach 3/4 Stunden war der Blutzucker bereits wieder auf 231 mg pro 100 ccm Blut gesunken. Nach einer Stunde waren es dagegen wieder 238,6 mg %, und dieser Wert wurde auch nach zwei Stunden noch gemessen.

Drei Stunden nach Versuchsbeginn war ein Anstieg auf 245,8 mg pro 100 ccm Blut festzustellen, und dann nahm der Blutzuckergehalt wieder ab. Nach vier Stunden waren es noch 229,8 mg %, nach fünf Stunden 213,6 mg/ 100 ccm Blut, nach sechs Stunden 197,4 mg % und nach sieben Stunden 191,9 mg %. Der Ausgangswert war damit nahezu wieder erreicht. Er wurde bis elf Stunden nach Versuchsbeginn weiter verfolgt, blieb jedoch unverändert.

Die Tauben zeigten keine Krampferscheinungen, sondern verhielten sich völlig normal.

Betrachtet man die beiden Kurven der Figur 5, die den Verlauf der eben beschriebenen Versuche deutlich machen sollen, so fällt folgendes auf:

Kurve I zeigt bei dem geringen Insulinanteil keine Hypoglykämie, die ja bei Kurve 2 gar nicht zu erwarten ist, weil die Insulinwirkung ausgeschaltet wurde (Versuch 7). Im Blutzuckeranstieg zeigen beide Kurven jedoch starke Unterschiede. So steigt die Kurve I, also die mit aktivem Insulin, in der doppelten Zeit nur halb so hoch an, behält eine Stunde den Höchstwert und kehrt wieder zum Normalwert zurück. Kurve 2 dagegen hat zwei Gipfelpunkte, und erreicht den Normalwert erst eine Stunde später als Kurve I, fällt jedoch $1\frac{1}{2}$ -mal so schnell ab.

Aus dem Verlauf der beiden Kurven können wir vermuten, daß das Insulin, auch wenn kein hypoglykämischer Effekt entsteht, zur Wirkung kommt. In Kurve I scheint doch die Glucagonwirkung durch das vorhandene aktive Insulin herabgesetzt zu sein. Das müßte jedoch noch genauer untersucht werden.

II) Elektrophorese

Allgemeines

Unter Elektrophorese versteht man allgemein den "Transportvorgang geladener Stoffteilchen in einem elektrischen Feld, in Gegenwart von Elektrolytionen". Als solcher ist die Elektrophorese der Ionophorese analog (Wiedmann 1953).

Das kolloidale Teilchen, durch den elektrischen Strom bewegt werden, ist schon seit Beginn des 18. Jahrhunderts bekannt und wurde zunächst an Suspensionen beobachtet und beschrieben. Da die Wanderungsgeschwindigkeit von der Ladung und Molekülgröße der einzelnen Teilchen abhängig ist, können so aus einem homogenen Gemisch verschiedenartige Fraktionen abgetrennt werden. Im Laufe der Zeit wurde nun versucht, die relativen Prozente der wandernden Fraktionen irgendwie zu bestimmen.

Hierbei gab es im Prinzip drei Möglichkeiten (Tiselius 1950):

1. die direkte Beobachtung der bewegten Partikel unter dem Mikroskop, die aber nur bis zu einer gewissen Größe möglich ist;
2. die Überführungsmethode, die bereits 1853 von Hittorf an Dissoziationsprodukten anorganischer Säuren und Salze angewandt wurde;
3. die 1886 von O. Lodge benutzte Methode der wandernden Grenzflächen, die auch von Tiselius beibehalten wurde.

Die Wanderung einzelner Fraktionen aus einem Proteingemisch, das sich in einem elektrischen Feld befindet, ist kurz auf folgende Tatsache zurückzuführen. Proteine liegen wegen der ampholytischen Natur der Aminosäuren je nach dem pH-Wert des sie umgebenden Milieus

entweder als Anionen, Kationen oder neutrale Moleküle vor (Lehnartz 1952).

Zum Beispiel:

R - CH ₂ - COOH NH ₃ ⁺	in saurer Lösung (pH ca 2) als Kation
R - CH ₂ - COO - NH ₂	in alkalischer Lösung (pH ca 12) als Anion
R - CH ₂ - COO ⁻ NH ₃ ⁺	in wässriger Lösung als neutrales Molekül (isoelektrischer Punkt)

(Dieser isoelektrische Punkt fällt nicht immer mit pH 7 zusammen, sondern liegt für manche Aminosäuren bereits bei pH 6).

Je nach der Zahl der Amino- und Carboxylgruppen können die verschiedenen Aminosäuren bei gleichem pH elektropositiv oder elektronegativ sein. Die Ionen wandern in einem elektrischen Feld entweder zur Kathode oder Anode, je nach der Art ihrer Ladung, wogegen die neutralen Moleküle an der Auftragstelle liegen bleiben. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Ionen ist außer von der Ladung, auch von der Molekülgröße und damit der Reibung mit dem umgebenden Medium (Pufferlösung) bzw. der Unterlage (Filtrierpapier) abhängig. Da diese Faktoren bei gleichartigem Eiweiß immer gleich sind, erhält man, nachdem die Spannung einige Zeit angelegt war, bei passend gewähltem pH eine Trennung in verschiedene saure, basische und neutrale Fraktionen.

Die elektrophoretische Trennung des Kalbinsulins,
Taubenpankreasextrakts und Taubenglucagons

A. Allgemeines

Insulin ist ein Eiweißkörper, dessen kleinste Einheit ein Molekulargewicht von 6000 hat und Disulphidbrücken aufweist. Durch Oxydation mittels Perameisensäure konnte Sanger 1949 die Disulphidbrücken sprengen, und damit die Vernetzung des Moleküls aufheben, wobei er ein aus zwei Anteilen bestehendes Produkt mit Sulfonsäuregruppen erhielt. Durch eine Fällungsfractionierung gelang eine präparative Trennung dieses Produktes in eine saure Fraktion A und basische Fraktion B (Sanger und Tuppy 1951, Sanger und Thompson 1953).

Glucagon, das zweite Kohlenhydratstoffwechselhormon der Bauchspeicheldrüse, besteht aus 29 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 3482 (Bromer, Sinn und Behrens 1957). Sie haben mittels Trypsin zwei Fraktionen des Glucagons unterschieden.

Fraktion A besteht aus:

Arg - (Ala - Glu₂ - Asp₂ Phe - Val - Try - Leu - Met - Thr.)¹⁾.

Fraktion B besteht aus:

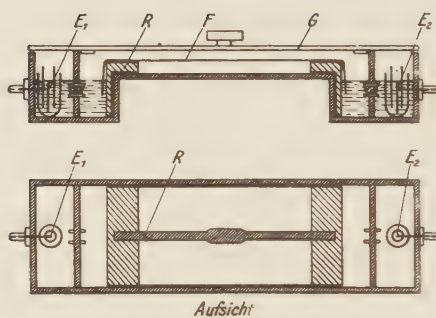
Als (Glu₂ - Asp₂ - Phe - Val - Try - Leu - Met - Thr.).

Die Trennung wurde bei pH 7,2, 15mA und 300 V vorgenommen.

1) Die Abkürzungen der Aminosäuren sind nach Edsall 1947 geschrieben.

Mohnike und Boser versicherten 1953, daß der blutzuckersteigernde Faktor nichts mehr als ein Glukoproteid ist, dessen isoelektrischer Punkt bei 4,6 liegt. Bei der Elektrophorese (pH 8,6) verhält er sich in seiner Wanderungsgeschwindigkeit etwa wie α_2 bis γ -Globuline. Er zeigt drei sehr nahe zusammenliegende Banden und enthält 9,5 % Hexose, vom Mannose-, Galaktose- und Hexosamintypus.

Das von Staub, Sinn und Behrens 1955 dargestellte Glucagon enthält dagegen keine Kohlenhydrate (siehe auch Seite 28).



Aufsicht

Abb. 1. Elektrophorese-Kammer, schematisch.

G = Glasdeckel; E₁, E₂ = Elektroden; F = Filtrierpapierstreifen; R = Kunststoffrahmen.

B. Beschreibung der Methodik

1. Verwendetes Material

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apparaturen kommen unter dem Namen Elphor H in den Handel (Abb.1 S.49a). Als Filtrierpapier diente Whatmann - I - Papier, als Puffer Veronal - Natriumacetat - Puffer vom pH 8,2. Das Ganze wurde einer Spannung von 110 V ausgesetzt (Stromstärke in dem Streifen 1 mA).

2. Beschicken des Streifens

Auf ein Filtrierpapier 4 x 40 cm werden etwa 0,005 ccm Kalbsinsulin, Taubenpankreasextrakt oder Taubenglucagon aufgetragen. Zu diesem Zweck wird der mit Puffer getränkte Streifen durch kurzes Auflegen auf eine Filtrierpapierunterlage von überschüssig anhaftendem Puffer befreit, an der Auftragsstelle selbst mit einem schmalen Stück trockenen Filtrierpapiers abgetupft und sofort auf den aus der Kammer herausgenommenen Rahmen straff aufgespannt. Dabei kommt die Haftung durch Adhäsion zustande (Grassmann und Hannig 1952). Sodann bringt man mittels einer Mikropipette die Lösung in Form eines feinen und gleichmäßigen, etwa 3,5 cm langen Querstriches auf den Streifen auf, wobei die Pipette bis zum Auslauf der gewünschten Menge einige Male gleichmäßig hin und her bewegt wird.

Man erzielt das gleichmäßige Aufbringen des Substanzgemisches nach längerer Übung und bekommt so schöne Pherogramme. Dabei ist darauf zu achten, daß der Streifen beim Auftragen nicht aufgerauht wird. Der mit zwei Streifen beschickte Rahmen wird sodann in die Kammer eingebracht, die mit dem Glasdeckel verschlossen und an die Stromquelle angeschlossen wird.

3. Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese dauert fünf Stunden, bei einer Klemmenspannung von 110 V. Die auf einen Streifen wirkende Spannung beträgt dann etwa 80 V, wobei ein Strom von etwa 1 mA durch ihn hindurchfließt. Zur Vermeidung von Verdunstungsfehlern wird das Ganze in einer dichtschießenden Kammer bei 10° C durchgeführt.

4. Entwickeln des Streifens

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Streifen mit dem Rahmen aus der Kammer herausgenommen und auf diesem etwa eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Sodann wird die Hälfte der Streifen hängend in einem Trockenschrank bei 100° C getrocknet, wobei die Proteine koagulieren. Nach Besprühen mit verdünnter Ameisensäure im Verhältnis 1 : 10 werden die Streifen noch einmal im Trockenschrank bei 100° C 10 Minuten lang getrocknet und dann mit 1 % Ninhydrin besprüht.

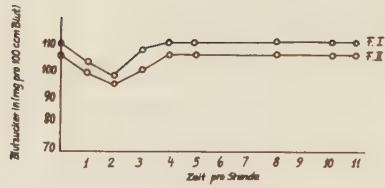
Die zweite Hälfte der Streifen trocknet weiterhin an der Luft. Die erste Hälfte der Streifen, auf der die verschiedenen Eiweißarten durch Färbung sichtbar gemacht wurden, wird neben die zweite Hälfte gelegt, auf der sich das Eiweiß in gleicher Anordnung, jedoch unsichtbar befindet. Entsprechend der Farbstreifen auf der sichtbaren Hälfte werden nun die ungefärbten, nicht sichtbaren Eiweißbänder herausgeschnitten. Nach den Methoden von Consden und seinen Mitarbeitern 1947, und Dent 1947, die hier verwendet wurden, wurde das Eiweiß aus den ausgeschnittenen, ungefärbten Stückchen eluiert. Dabei wurde das eine En-

de vom Eiweißband in destilliertes Wasser getaucht, während vom freien anderen Ende die eiweißhaltige Flüssigkeit in ein Röhrchen tropfte. Die darin gesammelte Lösung wurde den Kaninchen eingespritzt.

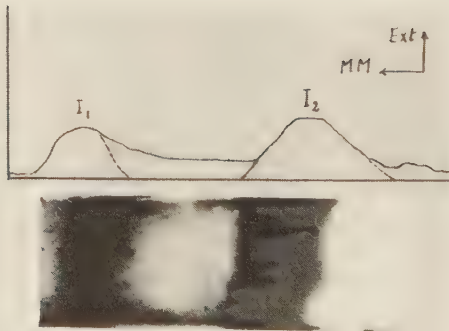
5. Photometrische Auswertung

Zur photometrischen Auswertung müssen die Streifen zunächst durchsichtig gemacht werden. Das wurde mit Hilfe des Elphor-Transpavac-Gerätes (Bender und Hobein, München) erreicht. Das Gerät besteht aus einem zylindrischen Glasgefäß, welches durch eine Verengung in zwei miteinander verbundene Teile getrennt ist. Der untere Raum dient zur Aufnahme der Transparenzflüssigkeit, während der darüberliegende Teil für die Aufnahme der Streifen vorgesehen ist. Das Gefäß ist mit einem luftdicht schließenden Deckel versehen und wird durch einen seitlichen Hahnstutzen über ein vernickeltes Spezialstativ mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Die Streifen sind in eine Mischung aus α -Bromnaphthalin + Paraffinöl eingelegt. Durch Imprägnieren sind die Streifen im Vakuum innerhalb einer halben Stunde blasenfrei. Die nach dem Auswerten mit Extinktionsschreiber II nach Zeiß erhaltenen Kurven werden in die, den einzelnen Fraktionen entsprechenden Gauss'schen Kurven zerlegt und durch Ausplanimetrieren deren relativer Prozentgehalt errechnet.

Figur VII



Der Einfluß von elektrophoretischen Fraktionen
glucagonfreiem Kalbsinsulin auf den Blutzucker
der Kaninchen
(Subcutan)



C. Ergebnis

1. Trennung von reinem Kalbsinsulin

Auf den Streifen werden 0,005 ccm Insulinlösung, hergestellt von der Firma Hormonchemie in Freimann, aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte bei 110 V und 2 mA mit einem Veronalpuffer von pH 8,2 fünf Stunden.

Die Hälfte der Streifen wurde zunächst eine halbe Stunde an der Luft, anschließend 10 Minuten bei 100° C im Trockenschrank getrocknet, und dann mit 1 : 10 Ameisensäure besprüht. Nach nochmaligem, 10 Minuten langem Trocknen bei 100° C wurde in gleicher Weise 1 : 100 Ninhydrin aufgetragen. Dabei wurden zwei Fraktionen sichtbar, die sich violett anfärbten.

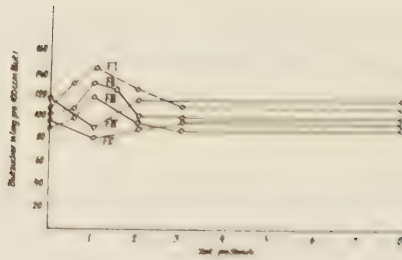
Aus der ungefärbten Hälfte der Streifen wurden - wie auf Seite 50 näher beschrieben - die Lösungen für die Spritzen gewonnen. Mein Ergebnis über Kalbsinsulin stimmt mit dem von Sutherland und seinen Mitarbeitern aus dem Jahre 1949, und Steigerwald und Schütte von 1953 überein.

Beim Auswerten des Streifens entstand die in Figur A (S.52a) dargestellte Kurve. Für die einzelnen Fraktionen ergaben sich beim Ausplanimetrieren folgende Werte:

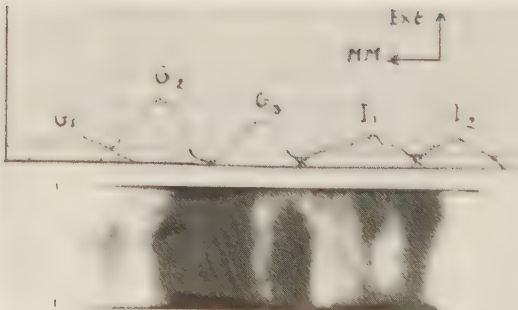
Fraktion	Flächenwert	relativer %-Gehalt
1	0,19	33,84 %
2	0,34	64,16 %

Wie aus der Kurve und Figur VI (S.52a) ersichtlich ist, liegt die stärkste Fraktion weit von der Auftragsstelle entfernt.

Figur IV



Die Zeit, um ein bestimmtes Fraktionier-
vermögen zu erreichen, ist mit dem Zeit-
punkt der Kurve.
(Schwundzeit)



2. Trennung vom Taubenpankreasextrakt

Die elektrophoretische Trennung des Taubenpankreas-extrakts in die verschiedenen Fraktionen verläuft ebenso wie beim Kalbsinsulin.

Die gesammelte eluierte Lösung wird den Kaninchen subcutan eingespritzt. In den Figuren B und VII (S. 53a) sieht man fünf Fraktionen hintereinander. Zwei Fraktionen riefen eine Blutzuckersenkung und drei eine Blutzuckersteigerung hervor.

Die ersten drei Fraktionen gehören zum Glucagon und die beiden anderen zum Insulin.

Beim Auswerten des Streifens entstand die in Figur B dargestellte Kurve. Für die einzelnen Fraktionen ergaben sich beim Ausplanimetrieren folgende Werte.

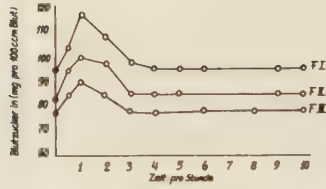
Fraktion	Flächenwerte	relativer %-Gehalt
1	0,15	18,75 %
2	0,24	30,00 %
3	0,17	21,25 %
4	0,11	13,75 %
5	0,13	16,25 %

Wie aus der Kurve und obigen Werten ersichtlich, war der relative Prozentgehalt des Glucagons ungefähr zweieinhalbmals größer als des Insulins, das Verhältnis von Glucagon zu Insulin betrug 7 : 3.

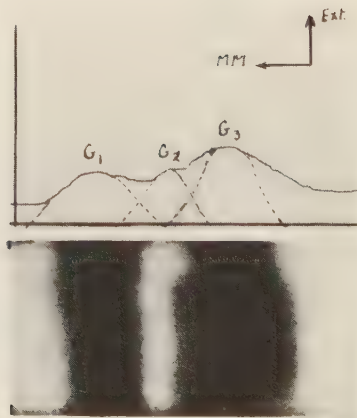
Die Elektrophorese des Taubenpankreasextrakts wurde fünfzigmal durchgeführt und das Blut der Kaninchen eingespritzt und ausgewertet, bis ich ein gutes Ergebnis erhielt. Dabei wurde wiederum ein Veronalpuffer mit dem pH von 8,2 verwendet.

Steigerwald und Schütte 1953 haben das Konkalbinsulin (= Kalbspankreasextrakt, nur in vier Fraktio-

Figur VII



Der Einfluss von elektrophoretischen Fraktionen
von insulinfreiem Glucagon des Taubenpan-
kreasextraktes auf den Blutzucker der Kanin-
chen
(Subcutan).



nen getrennt. Die beiden langsamen Fraktionen lieferten Glucagon und die beiden schnelleren Insulin. Der benutzte Veronalpuffer hatte einen pH von 8,6. Das Ganze dauerte bei 220 V und 40 mA dreißig Stunden.

3. Trennung von Taubenglucagon

Zunächst wurde das Insulin inaktiviert (siehe S.29). Dann folgte die Elektrophorese, die, wie beim Kalbsinsulin und Taubenpankreasextrakt, durchgeführt wird.

Die ungefärbte Hälfte der Streifen lieferte wieder die Lösung, die den Kaninchen subcutan eingespritzt wurde. Die Blutzuckeränderungen zeigt Figur VIII, S.54a.

Die gefärbte Hälfte der Elektrophoresestreifen machte drei Fraktionen sichtbar.

Beim Auswerten ergab sich die in Figur C S.54a dargestellte Kurve. Daraus leiteten sich für die einzelnen Fraktionen beim Ausplanimetrieren folgende Werte ab:

Fraktion	Flächenwerte	relativer %-Gehalt
1	0,22	41,77 %
2	0,12	15,23 %
3	0,34	43,00 %

Wie aus der Kurve und Figur 8 ersichtlich ist, liegt die schwächste Fraktion in der Mitte.

Dieses Ergebnis dreier Fraktionen Glucagon unterscheidet sich von den Befunden von Steigerwald und Schütte 1953, Bromer, Sinn und Behrens 1957 über Rohinsulin vom Kalbspankreas. Sie hatten nur zwei Glucagon-Fraktionen.

Mohnike und Boser erhielten 1953 vom HGF (Glukoproteid) ebenfalls drei Fraktionen beim kalb und kind,

jedoch stellen sie Zucker fest, während meine Proben auf Zucker beim Taubenglucagon negativ ausfielen (siehe S. 29). Unser Glucagon ist also kein Glukoproteid.

Wie schon auf Seite 3 und Seite 23 erwähnt wurde, machten verschiedene Forscher die Erfahrung, daß Säugetiere im allgemeinen einen geringeren Glcagongehalt besitzen als Vögel und diese viel weniger empfindlich auf Insulin reagieren. Es ließe sich vermuten, daß das nicht nur mit dem anderen Verhältnis vom Glucagon zum Insulin im Pankreasextrakt der Vögel zusammenhängt, sondern auch mit dem hier festgestellten Unterschied in der Anzahl der Fraktionen des Glucagons. Das wäre freilich noch genauer zu untersuchen.

III) Histologie

A) Allgemeines

Die Bauchspeicheldrüse ist allen Wirbeltieren eigentümlich. Sie ist von besonderem Interesse für Physiologen gemäß der Entdeckung der inneren Sekretion des Organs von Banting und Best im Jahre 1922, wegen der therapeutischen Verwendung ihres Produkts zur Behandlung der menschlichen Zuckerkrankheit.

Von anatomischer Seite war entscheidend, daß Langerhans 1869, das sogenannte Inselgewebe im Pankreas entdeckte. Von den Amphibien aufwärts ist überall typisches Inselgewebe vorhanden. Die Zahl der im Pankreas verteilten Inseln ist bei den Säugetieren außerordentlich groß, sie beträgt bei der Ratte bis 24,000, beim Menschen 200.000 - 1.700.000 (von Buddenbrock 1950). Bei Vögeln ist die Bauchspeicheldrüse immer eine kompakte Drüse. Sie liegt im Mesoduodenum zwischen den beiden Schenkeln der Duodenalschlinge (Bromen und Lund 1957).

Bei Tauben ist die hier weiße Bauchspeicheldrüse besonders groß, 5-6 cm lang und ebensoviel mm breit. Sie besteht aus einem dorsalen und einem ventralen Teil. Beide Teile sind etwa in der Mitte durch eine breite Brücke miteinander verbunden, so daß hier das Gesamtorgan ungefähr die Form einer Eisenbahnschienen annimmt. Aus jener Brücke sieht man die beiden Ductus pancreatici hervortreten. Sie laufen neben dem aufsteigenden Duodenalschenkel rostralwärts und münden getrennt in seine linke Wand dicht unter der Mündungsstelle des rechten Ductus hepaticus. Das Pankreas der Taube ist eine zusammengesetzte verzweigte alveoläre Drüse (Krause 1922).

Vincent und Thompson 1908 und auch Kumagai und Ukai 1930 behaupteten, daß das Pankreas aus einem dorsalen Teil, einem ventralen Teil und einem Teil, nahe der Milz gelegen, zusammengesetzt sei.

Langerhans'sche Inseln besitzt das Pankreas der Taube in wechselnder Zahl und zwar sind sie im ventralen Pankreas klein und spärlich, im dorsalen größer und zahlreicher. Der zur Milz hin gelegene Abschnitt des Taubenpankreas ist durch eine Anzahl großer Inseln gekennzeichnet, die auf der entgegengesetzten Seite der Drüse meist fehlen. Meist liegen die Zellen in den Inseln regellos nebeneinander, in anderen Fällen sind sie zu netzförmig miteinander verbundenen Strängen angeordnet (Vincent und Thompson 1908, Krause 1922).

Lane und Bensley wiesen 1907 und 1911 das Vorkommen von zwei Zellarten, der α - und der β -Zellen, in den Inseln nach. Kumagai und Ukai stellten 1930 fest, daß die Form der Taubenpankreas, trotz wechselnder Größe der Inseln, vor allem von den α -Zellen bestimmt wird, im Gegensatz zur Pankreas anderer Tiere, wo diese α -Zellen viel weniger zahlreich sind, so daß sich die β -Zellen infolgedessen stark ausbreiten, also den größeren Teil der Inseln einnehmen. Oft sieht es so aus, als ob alle Inseln des Taubenpankreas nur aus α -Zellen bestünden. Viele der kleinsten Inseln enthalten bisweilen nur sehr wenige β -Zellen. Es besteht kein Zweifel, daß das ausgedehnte Inselgewebe mit der großen Zahl von α -Zellen zusammenhängt.

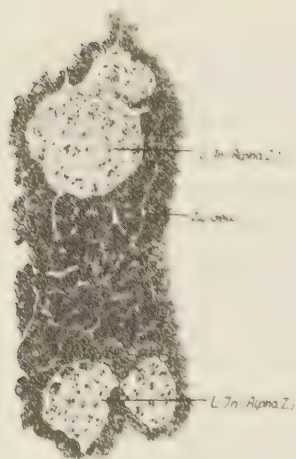
1942 fand Miller im Pankreas der Taube drei Arten von Inselzellen, die α -, β - und δ -Zellen. Im allgemeinen gibt es zwei Inseltypen, die entweder aus

α - und d- oder aus β - und d-Zellen aufgebaut sind.

B) Beobachtungen

Die Bauchspeicheldrüse der getöteten Taube wurde sogleich herausgeschnitten und in Bouin fixiert nach Gomori aus dem Jahre 1939. Die Konservierungsflüssigkeit besteht aus einem Teil Formalin, 4-5 Teilen einer gesättigten Picrinsäuren-Lösung und jeweils 2,5 % Eisessig und Sulphosalicylsäure. Vor Gebrauch wird das Ganze mit gleichen Teilen destilliertem Wasser versetzt. Das Fixieren dauert etwa 20 Stunden und nun wird mit verschieden starkem Alkohol das Wasser entzogen. Dann wird das Ganze jeweils zwei Stunden lang in flüssiges Paraffin vom Schmelzpunkt 42 und 56° C gelegt und daraufhin eingebettet. Die Schnitte waren vier μ dick. Nachdem das Paraffin herausgelöst war, wurden die Schnitte eine Minute lang mit einer Lösung behandelt, die je 0,3 % Kaliumpermanganat und Schwefelsäure enthielt. Sie wurden in Wasser ausgewaschen und mit einer 1 - 5%igen Lösung von Kaliummetabisulfit entfärbt. Dann wurde gründlich mit Wasser gespült. Ohne vorherige Oxydation mit Kaliumpermanganat lassen sich die β -Granuli nicht färben (Gomori 1939).

Die meisten, wenn nicht alle der verwendeten Färbemethoden zur Unterscheidung der Zelltypen in den Langerhans'schen Inseln sind mehr oder weniger unbestimmt und unzuverlässig. Die Färbung mit dem neutralen Gentianaviolett-Orange nach Bensley 1907 liefert beim Meerschweinchen sehr schöne Ergebnisse, bei anderen Tierarten ist sie jedoch sehr wenig weniger zuverlässig. Die Mallory-Heidenhain-Azan-Methode kann fast bei allen Tierarten angewandt werden, macht jedoch nur die Granuli der α -Zellen deutlich kenntlich. Auch die Haematoxylin-Eosinfärbung zeigt bei gut fi-



Taubenpankreas im Querschnitt

(270fach vergr.)

Abb. 1



Taubenpankreas im Querschnitt

(300fach vergr.)

Abb. 2



Taubenpankreas im Querschnitt

(580fach vergr.)

Abb. 3

Bl. K. = Blutkapillar

Z. = Zellen

L.In. = Langerhans'schen Inseln

Zy. Gew. = Zymogengewebe

xierten Geweben einen deutlichen Unterschied zwischen α - und β -Zellen (Gomori 1939).

Zunächst hatte ich es mit Gentianaviolett-Orange, und Haematoxylin-Eosin versucht, bekam jedoch beide Male negative Ergebnisse. Daraufhin wandte ich die Methode von Gomori aus dem Jahre 1939 zur Färbung der Schnitte an wie folgt:

Nachdem die Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe geführt worden waren, wurden sie 15 Minuten lang in gereiftem Chromhaematoxylin gefärbt. Anschließend wurde mit Wasser gespült und in Alkohol überführt, der 1 % konz. Salzsäure enthielt.

Nach nochmaligem Spülen wurden die Schnitte mit Phloxin eine Minute lang gegengefärbt. Daraufhin wurden sie wiederum gespült und kurz mit einer 5%igen Phosphorwolframsauren Lösung behandelt. Die Schnitte wurden nun mit verschieden starkem Alkohol entwässert, in Xylol gereinigt, und in Canadabalsam eingelegt. Auf diese Weise färbten sich Pankreasgewebe und β -Zellen blau, während die α -Zellen blaß erschienen.

Aus den Abbildungen und Schnitten geht klar hervor, daß der zur Milz hin gelegene Pankreaslappen sehr inselreich ist, besonders an großen Inseln, während der ventrale Pankreaslappen nur sehr wenige Inseln enthält (Abb. 1, 2, S. 59a). Die große Insel, wie sie in Abb. 2 zu sehen ist, besteht nur aus α -Zellen. Sie fand sich im zur Milz hin gelegenen Pankreaslappen. Die β -Zellen konnten nur in sehr geringer Zahl festgestellt werden. Sie wurden von α -Zellen umgeben in den Inseln des zur Milz hin gelegenen Pankreaslappens gesehen (Abb. 3 S. 59a).

Die Inselzahl der 100 Schnitte, die durch den sich zur Milz hin erstreckenden Pankreaslappen gelegt wurden, beträgt ungefähr 1000. Der ventrale Lappen enthält etwa 150 Inseln in ebenfalls 100 Schnitten.

Kumagai und Ukai zählten 1930 in zur Milz hin gelegenen Lappen im ganzen etwa 2220 Inseln pro 1000 qmm und in den anderen Lappen 760 pro 1000 qmm.

Sie machten die gleiche Beobachtung wie ich (siehe auch Seite 57), daß in allen Teilen der Inseln im Gegensatz zu anderen Tieren die Zahl der α -Zellen weit größer ist, als die der β -Zellen. Die α -Zellen setzen also den größeren Teil der Inseln zusammen. Es kommt sehr oft vor, daß die ganze Insel nur aus α -Zellen aufgebaut ist.

IV. Diskussion

Der erste Versuch, bei dem den Kaninchen Kalbsinsulin eingespritzt wurde, zeigte, daß die Ampullen der Firma "Hormonchemie" aus Freimann Glucagon enthielten, obwohl diese als glucagonfrei bezeichnet waren. Der Blutzuckergehalt der Kaninchen stieg innerhalb von fünf Minuten um 4 mg/100 ccm Blut. Das Insulin begann dagegen erst 5 Minuten nach der Spritze zu wirken, allerdings dann sehr stark; denn eine Stunde nach der Insulinspritze war der Blutzucker schon auf die Hälfte herabgesunken und hatte damit seinen tiefsten Stand erreicht, was auch Burn, Finney und Goodwin 1950 beobachtet haben. Erst fünf Stunden nach Versuchsbeginn nahm der Blutzucker wieder den normalen Wert an.

Daß dem handelsüblichen Insulin vom hyperglykämisch-glycogenolytischen Faktor oder Glucagon beige-mengt ist, stimmt mit den Beobachtungen vieler Autoren überein (siehe S.22).

Um die Wirkung des Taubenpankreasextrakts auf Kaninchen zu verfolgen, wurde der zweite Versuch angesetzt. Dabei trat genau das Gegenteil von dem ein, was ich auf Grund der mit Säugetieren bisher gemachten Erfahrungen erwartet hatte: Der Blutzuckerspiegel begann zu steigen. In meinem Fall trat diese Veränderung allerdings erst $\frac{1}{2}$ Stunde nach Versuchsbeginn auf.

Bereits nach einer Stunde - immer vom Beginn des Versuches aus gerechnet - war der höchstwert erreicht. Dieser rasche Anstieg, der sich innerhalb einer halben Stunde vollzog, ging erst im Laufe von zwei Stunden wieder zurück. Drei Stunden nach Versuchsbeginn wurde der Normalwert wieder erreicht. Die eigentlich erwartete Wirkung des Insulins trat überhaupt erst acht Stunden

nach Versuchsbeginn in Erscheinung. Innerhalb einer Stunde trat eine Blutzuckeränderung um 20 mg/100 ccm Blut ein, und nach zwei Stunden, also neun Stunden nach Versuchsbeginn, wurde der niedrigste Wert mit 71,3 mg/100 ccm Blut gemessen. Der Normalwert von 100,2 mg/100 ccm Blut wurde erst zwölf Stunden nach Versuchsbeginn wieder erreicht.

Bezüglich der Änderung des Blutzuckerspiegels wirkten Insulin und Glucagon in entgegengesetzten Richtungen gleich stark, jedoch hielt die Insulinwirkung länger an. Die mit dem Glucagon vergleichbaren Änderungen des Blutzuckerspiegels traten also in größeren Zeitabständen ein.

Kumagai und Ukai machten 1930 bei den gleichen Versuchen von Taubenpankreasextrakt bei Kaninchen gegenteilige Beobachtungen. Sie stellten innerhalb von fünf Stunden überhaupt keine Blutzuckererhöhung fest, sondern immer eine Abnahme um 14 mg nach einer Stunde, und nach fünf Stunden war der Blutzucker bereits wieder normal.

Ihre Ergebnisse stehen allerdings heute auch im Widerspruch mit ihren Beobachtungen bei der gleichen Untersuchung. Sie sagten in ihrer Abhandlung "Studies on the internal secretion of the Pancreas" auf S. 160¹⁾, daß bei der Taube die Langerhans'schen Inseln aller Größen überwiegend aus α -Zellen aufgebaut seien, was auffallend gewesen sei im Vergleich zu anderen Tieren, wo die α -Zellen viel weniger zahlreich sind, so daß sich die β -Zellen infolgedessen stark ausbreiten, also den größeren Teil der Inseln einnehmen. "Bei den Tauben bilden die α -Zellen den größeren Teil aller Inseln der Drüse. Es kommt sehr oft vor, daß die ganze Insel nur aus α -Zellen zusammengesetzt ist."

1) The Tohoku Journal of Experimental medicine, Bd.16 (1930), S.157-168

In dem nach der Milz gelegenen Pankreasteil fanden Kumagai und Ukai 2220 Inseln auf 1000 qmm im Gegensatz zu 760 Inseln auf 1000 qmm in allen anderen Pankreasteilen, auch waren diese Inseln nahezu nur aus α -Zellen aufgebaut. Auf S. 168 der obengenannten Schrift heißt es weiter: "Schließlich erhebt sich die Frage, ob die

α - und β -Zellen der Langerhans'schen Inseln vollkommen verschiedene Funktionen erfüllen oder ob der Unterschied nur auf verschiedenen Funktionen ein und derselben Zellart beruht, die je nach den funktionellen Erfordernissen als die eine oder die andere Zellart erscheint." Diese Überlegungen schließen mit der Behauptung, daß die zwei Zellen ganz getrennte Funktionen wahrnehmen.

Wie wir jetzt wissen, liegen die α -Zellen in der Ursprungsgegend des Glucagons, was Ferner, Gaede und Kastrup 1950, Davis 1952, Holt und Mitarbeiter 1955 und Piero und Mitarbeiter 1957 bewiesen haben.

Durch die Versuche von Weitzel, Buddecke und Kraft aus dem Jahre 1956 mit Pankreasextrakt von Enten und Hühnern wurde mein Ergebnis gestützt. Sie vermuteten, wie bereits auf S. 23 zitiert, daß auf Grund des α -Zellenreichtums der Glucagongehalt des Vogelpankreas höher sein müsse als bei Säugetieren. Auch berichteten sie über die Blutzuckerwirkung von Pankreasextrakten des Huhns, wobei mit besonderer Regelmäßigkeit stark ausgeprägte Glucagoneffekte auftraten. An anderer Stelle berichteten sie über die Blutzuckerwirkung von Extrakten des Gesamtpankreas der Ente, die auf einen erheblich höheren Glucagongehalt und etwas schwächeren Insulingehalt als bei Pankreasextrakten von Säugetieren schließen läßt.

Wie auf S. 23 erwähnt, schätzten Vuylsteke und Du Duve 1953, daß die Pankreasextrakte der Vogel etwa zehnmal mehr Glucagon als diejenigen der Säugetiere enthalten.

Auf Grund der Feststellungen von Kumagai und Ukai und auch der eigenen Untersuchungen (siehe S. 57, 59), daß die α -Zellen im Taubenpankreas bei weitem überwiegen und den Feststellungen von Ferner, Gaede und Kastrup 1950 und den anderen vorgenannten Autoren, daß die α -Zellen in der Ursprungsgegend des Glucagons liegen, können wir annehmen, daß der Taubenpankreasextrakt zum größten Teil aus Glucagon besteht, begleitet von geringen Insulinmengen. Daraus lassen sich auch meine Beobachtungen erklären, daß Taubenpankreasextrakt bei Kaninchen zunächst eine Hyperglykämie auslöst, der eine Hypoglykämie folgt. Das steht im Gegensatz zu Kumagai und Ukai, die 1930 nur eine Hypoglykämie beobachteten. Für meine Ergebnisse sprechen auch die Parallelversuche von Weitzel und Mitarbeitern (1956) mit Hühnern und Enten.

Der dritte Versuch war ein reiner Glucagonversuch. Dazu wurde das Insulin des Taubenpankreasextrakts unwirksam gemacht. Das Glucagon kam deshalb sofort zur Wirkung, während beim vorigen Versuch mit Taubenpankreasextrakt das Glucagon erst nach einer halben Stunde zu wirken begann. Das beruht wahrscheinlich auf der Blockierung des Glucagons durch das beigemengte Taubeninsulin und das körpereigene Insulin des Kaninchens. Der Blutzucker erreichte eine Stunde nach Versuchsbeginn seinen Höchstwert und war nach vier Stunden wieder normal. Nach acht und neun Stunden war kein Einfluß mehr zu bemerken, ein Beweis, daß das Insulin völlig ausgeschaltet war.

Der Normalblutzuckergehalt unserer Tauben schwankt zwischen 178 und 201 mg/100 ccm Blut. Bei Erlenbach (1938) lag der Schwankungsbereich des Normalblutzuckergehalts zwischen 184 und 224 mg/100 ccm Blut. Außerdem stellte er 25% reduzierende Nichtzuckeranteile im Blut der Tauben fest. Das stimmt mit meinen Beobachtungen

während derselben Versuche überein. Diese Messungen über den Normalblutzuckergehalt und die reduzierenden Nichtzuckeranteile sowie die vier folgenden Faktoren, deren Zusammenhang mit dem Blutzucker wir zu ergründen versuchten, bilden den Versuch vier.

Alter Geschlecht, Temperatur und Hunger beeinflussen den Blutzuckerspiegel der Tauben nicht. Das stimmt mit den Befunden von Honeywell 1921, Erlenbach 1938 und Sturkie 1954 überein.

Der fünfte Versuch bewies, daß die Tauben eine hohe Widerstandskraft gegen Insulin besitzen, was ja auch andere Autoren bestätigen (S.3). Eine Spritze von 60 Insulineinheiten rief keine Hypoglykämie hervor, und die Tauben verhielten sich normal. Unterschiede ergaben sich jedoch in der Stärke der tödlichen Dosis. Alle Autoren mit Ausnahme von Chen und seinen Mitarbeitern gaben an, daß eine Taube von einer 6-30fachen Kaninchen-dosis stirbt. Chen mußte dagegen 1945 zwischen 400 und 1200 Insulineinheiten pro kg Körpergewicht anwenden, um hypoglykämische Kramp fzustände auszulösen.

Bei meinen Versuchen wirkten 360 Einheiten pro kg Körpergewicht für eine Taube tödlich, obwohl nach fünf Stunden der normale Blutzuckerspiegel wieder erreicht wurde, während er bei 840 Einheiten pro kg Körpergewicht ständig sank bis die Tauben an Erschöpfung eingingen. 240 Einheiten pro kg Körpergewicht lösten bereits in einer Stunde eine starke Blutzuckersenkung aus, doch nach drei Stunden war der Blutzucker bereits wieder normal.

Der Verlauf war ähnlich wie der von 360 Einheiten pro kg Körpergewicht, jedoch nicht ganz so heftig, auch hatte er nur eine eintägige Appetitlosigkeit zur Folge. 180 Einheiten pro kg Körpergewicht änderten dagegen den Blutzucker gar nicht mehr.

Der Versuch zeigte, wie widerstandsfähig die Tauben gegen Insulin sind und daß die tödliche Dosis zwischen 240 und 360 Einheiten pro kg Körpergewicht liegt. Sie beträgt das 720-fache der Insulinmenge, die normalerweise einem Kaninchen eingespritzt wird, um seinen Blutzuckergehalt auf die Hälfte herabzusetzen.

Im Versuch sechs wurde die Wirkung des Taubenpankreasextrakts bei Tauben verfolgt. Die blutzuckersteigernde Wirkung zeigte sich bereits nach 5 Minuten und erreichte schon nach einer Stunde ihren Höhepunkt. Erst sechs Stunden nach Versuchsbeginn war der Blutzuckerspiegel wieder normal. Nach acht und neun Stunden zeigte sich keine Hypoglykämie mehr wie bei den Kaninchen. Wenn wir die Versuche mit Taubenpankreasextrakten bei Kaninchen und Tauben miteinander vergleichen (siehe Tabelle 3 und 9), so fällt folgendes auf: Bei den Kaninchen setzte die Glucagonwirkung erst nach einer halben Stunde ein, während sie bei den Tauben bereits nach fünf Minuten festzustellen war. Die Insulinwirkung, die bei den Kaninchen nach acht Stunden noch die gleiche Stärke erreichte wie die anfängliche Wirkung des Glucagons, trat bei den Tauben überhaupt nicht in Erscheinung. Wir können vermuten, daß das auf dem großen Glucagonanteil, der vom Taubenpankreasextrakt gebildeten Hormone beruht. Dadurch, daß das Taubenpankreas neben anderen Hormonen in der Hauptsache Glucagon ausscheidet, kommt das eingespritzte Glucagon des Taubenpankreasextrakts sofort zur Wirkung. Beim Kaninchen dagegen wird, wie allgemein bei den Säugern, vom körpereigenen Pankreas in der Hauptsache Insulin ausgeschieden, das die Wirkung des eingespritzten Taubenglucagons verzögert.

Die Unterschiede der beiden Versuche in bezug auf das Insulin lassen sich ebenfalls auf Grund der ver-

schiedenen Verhältnisse der beiden Hormone bei Säugetieren und Vögeln deuten. Bei den Säugern spielt das Insulin als blutzuckersteuerndes Hormon die Hauptrolle, und so kommt wegen des hohen Insulinanteils an den vom eigenen Pankreas erzeugten Hormonen beim Kaninchen auch das wenige Taubeninsulin nach acht Stunden noch zur Wirkung. Bei den Tauben dagegen ist eine große Menge Insulin nötig, um den Blutzucker zu senken, so daß die geringere Insulinmenge, die im Taubenpankreasextrakt enthalten ist, nicht ausreicht, um nach acht Stunden eine meßbare Wirkung hervorzurufen.

Im siebten Versuch war die Wirkung des Glucagons besonders stark, nachdem das Insulin des Taubenpankreasextrakts inaktiviert worden war (siehe Tabelle 10). Bereits eine halbe Stunde nach Versuchsbeginn war der Höchstwert des Blutzuckers erreicht, der doppelt so hoch über dem Normalwert lag wie in Versuch 6, wo der Höchstwert erst nach einer Stunde erreicht wurde. Die Glucagonwirkung hielt auch eine Stunde länger an als im vorigen Versuch. Besonders auffallend ist, daß der Blutzucker, nachdem er nach Erreichen des Höchstwertes wieder stark abgenommen hat, noch einmal ansteigt, ehe er ganz zum Normalwert zurückkehrt.

Das Kalbsinsulin wurde elektrophoretisch in zwei Fraktionen zerlegt, was mit den Beobachtungen von Sutherland und seinen Mitarbeitern aus dem Jahre 1949 und denen von Steigerwald und Schütte aus dem Jahre 1953 übereinstimmt. Der Taubenpankreasextrakt dagegen wurde durch die Elektrophorese in fünf Fraktionen gespalten, zwei aus Insulin und drei aus Glucagon, wie dies durch Auszüge aus den Elektrophoresestreifen und Einspritzungen bei Kaninchen geprüft wurde. Das Glucagon wanderte

sehr viel langsamer als das Insulin (Sutherland und Mitarbeiter 1949). Steigerwald und Schütte bekamen 1953 von Rohkalbsinsulin vier Fraktionen, zwei aus Glucagon und zwei aus Insulin.

Das Taubenglucagon zerfiel bei meinen elektrophoretischen Untersuchungen in drei Fraktionen. Bromer und seine Mitarbeiter bekamen 1956 vom Kalbsglucagon nur zwei Fraktionen. Mohnike und Boser erhielten dagegen bei Kalb und Rind von ihrem hyperglykämisch-glycogenolytischen Faktor ebenfalls drei Fraktionen. Sie stellten jedoch Zucker fest, während meine Proben auf Zucker beim Taubenglucagon negativ ausfielen. Das Taubenglucagon ist also kein Glucoproteid.

Bei den wenigen elektrophoretischen Untersuchungen, die von den genannten Autoren und von mir durchgeführt wurden, sind noch keine Vergleiche möglich, doch fällt schon eines auf: Das Taubenglucagon zerfällt in drei Fraktionen, während das Kalbsglucagon nur aus zwei Fraktionen besteht. Allerdings müssen wir dann von dem hyperglykämisch-glykogenolytischen Faktor von Mohnike und Boser absehen, der sich ja auch ganz deutlich durch seinen Zuckergehalt vom Glucagon unterscheidet.

Das durch Elektrophorese ermittelte Verhältnis von 7 : 3 zwischen Glucagon und Insulin im Taubenpankreasextrakt gibt uns einen weiteren Hinweis über die Rolle des Glucagons bei Vögeln.

Histologisch betrachtet, besitzt das Pankreas der Taube eine große Zahl von Inseln im zur Milz gelegenen Abschnitt des Pankreas, sehr wenige dagegen in den anderen Abschnitten, etwa im Verhältnis 20 : 3. Die Inseln sind meist aus α -Zellen und nur aus β -Zellen aufgebaut.

Aus all den oben durchgeführten Versuchen ist die große Widerstandsfähigkeit der Tauben gegen Insulin meiner Meinung nach aus folgenden Ursachen verständlich:

- 1) Das Pankreas der Taube einschließlich der Langerhans'schen Inseln ist zum größten Teil, wenn nicht ganz, mit wenigen Ausnahmen, aus α -Zellen, dagegen sehr wenig aus β -Zellen aufgebaut.
- 2) Diese α -Zellen, wie wir sie bis jetzt kennen, sind der Ursprung des zweiten Kohlenhydratstoffwechselhormons der Bauchspeicheldrüse, des Glucagons.
- 3) Der hyperglykämisch-glycogenolytische Faktor der Taube erwies sich bei meinen Untersuchungen als Glucagon und nicht als Glucoproteid.
- 4) Der normal hohe Blutzucker der Tauben steht vielleicht in enger Beziehung mit der fortlaufenden Glucagonabsonderung. Sicher ist die Wechselbeziehung mit dem hohen Körperstoffwechsel und dem Fliegen.
- 5) Sturkie nahm 1954 an, daß Insulin zur Kontrolle des Blutzuckers der Vögel nicht nötig sein, bzw. daß die Vögel gar kein Insulin besitzen oder sehr viel weniger als die Säugetiere. Daß das Insulin für die Oxydation im Vogelkörper eine sehr kleine Rolle spielt, wurde auch von Chen, Anderson und Maze 1945 angenommen.
Das stützt wiederum meine Ansicht, das nur wenig Insulin in der Taubenpankreas gebildet wird, was bereits im physiologischen Teil erwähnt wurde.
- 6) Piero und seine Mitarbeiter behaupteten 1957:
"Das Glucagon schützt den Organismus gegen Hypoglykämie, indem es dem nützlichen Speicher, der Leber, schnell Glucose entzieht, so wie das Paraschilddrüse"

senhormon den Körper gegen die Hypokalemia schützt, indem es aus dem sehr nützlichen Speicher, den Knochen, rasch Kalzium freisetzt, Glucogan wird im Pfortensystem ausgeschieden und erreicht die Leber direkt. Dies steht im Gegensatz zu Adrenalin, das ebenfalls durch Fördern der Leberglycogenolyse die Hyperglykämie verursacht, jedoch die Leber erst erreicht, nachdem es durch den ganzen Kreislauf gewandert ist und zum großen Teil Oxydation stattgefunden hat. So ist Glucagon wegen seiner Wirkungskraft, seinem Entstehungsort und seiner direkten Wirkung auf die Leber ideal für die Regulierung der täglichen Blutzuckerschwankungen."

Der im Vergleich mit Säugern hohe Normalwert des Blutzuckers der Tauben beruht wahrscheinlich darauf, daß das Glucagon mengenmäßig weitaus den größten Anteil an der Gesamtmenge der erzeugten Hormone hat, die für die Regulierung des Blutzuckerspiegels verantwortlich sind. Daraus könnte man schließen, daß, um bei Tauben Hypoglykämie hervorzurufen, eine große Menge Insulin nötig ist, um diesen hohen Glucagonbetrag, der von dem Pankreas abgeschieden wurde und zugleich auch die hypophysen- und adrenal-cortikalen Antiinsulinhormone unwirksam zu machen. Von diesem Standpunkt aus ist die Ursache des Widerstandes der Tauben gegen Insulin zu verstehen.

V. Zusammenfassung

- 1) Dem handelsüblichen Insulin ist der hyperglykämisch-glykogenolytische Faktor (= Glucagon) beige-mengt.
- 2) Der Pankreasextrakt der Taube ist größtenteils aus Glucagon und nur zu einem geringen Teil aus Insulin aufgebaut.
- 3) Der HGF (= Glucagon) des Taubenpankreasextrakts wirkt beim Kaninchen $3/4$ Stunden nach der Injektion, das beigemengte Insulin erst acht Stunden nach der Einspritzung.
- 4) Der HGF (= Glucagon) der Taube ist im Gegensatz zum HGF von Mohnike und Boser zuckerfrei, also kein Glucoproteid.
- 5) Die Tauben widerstanden einer Insulindosis von 60 Einheiten. Das ist auf das Körpergewicht umgerechnet der 360-fache Betrag der Insulinmenge, die beim Kaninchen eine Verringerung des Blutzuckers um die Hälfte des Normalwertes zur Folge hat.
- 6) Die Tauben starben an Insulinmengen mit 360 und mehr Insulineinheiten / kg Körpergewicht.
- 7) Die mit Taubenpankreasextrakt gespritzten Tauben zeigten nach acht Stunden keine Hypoglykämie mehr, wie das bei den mit Taubenpankreasextrakt behandelten Kaninchen beobachtet wurde.

- 8) Das reine Kalbsinsulin wurde elektrophoretisch in zwei Fraktionen zerlegt.
- 9) Der Taubenpankreasextrakt zerfiel elektrophoretisch in fünf Fraktionen: zwei aus Insulin und drei aus Glucagon, das langsamer wanderte als das Insulin.
- 10) Schließlich wurde das Glucagon allein in drei Fraktionen aufgespalten.
- 11) Nach der elektrophoretischen Trennung von Glucagon und Insulin betrug das Mengenverhältnis 7 : 3.
- 12) Das Taubenpankreas wird von einer großen Zahl Langerhans'scher Inseln aufgebaut, die vor allem in den dorsalen Abschnitten und dem zur Milz hingele- genen Abschnitt vorkommen.
- 13) Die Langerhans'schen Inseln im Pankreas der Taube sind zum größten Teil aus α -Zellen und nur aus wenigen β -Zellen aufgebaut.
- 14) Die Zahl der Inseln in den hundert Schnitten des zur Milz hin gerichteten Abschnitts beträgt über tausend, während in den anderen Pankreasabschnit- ten nur etwas über einhundertfünfzig Inseln auf hundert Schnitte verteilt sind.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) Al-Gauhari, A.E.I., On the blood sugar in *Clarias Lazera*
C.et V., Z.f.vergl.Physiol.41,26 (1928)
- 2) Audy, G., und The content of glycogenolytic factor
Gerly, M., in some Insulin samples,
Biochem.J. 52,70 (1952)
- 3) Banting, F.G., und The internal secretion of the pancreas,
Best, C.H., J.Lab.clin.Med.7,251 (1922)
- 4) Bensley, R.R., The oesophageal glands of *Urodela*,
Biol.Bull.2,87 (1906-1907)
- 5) Bensley, R.R., Studies on the pancreas of the guinea
pig, Amer.J.Anat.12,297 (1911 - 1912)
- 6) Bertrand. G., Le dosage des sucres reducteurs,
Bull.Soc.Chim., Paris 3,35 (1906)
- 7) Beutler, R., Vergleichende Betrachtungen über den
Zuckergehalt des menschlichen und
tierischen Blutes,
Ergeb.d.Biol.17,1 (1939)
- 8) Bender und Hobein, Gebrauchsanweisung für Elphor (nach
Grassmann und Hannig) erhält Bender
und Hobein, München
- 9) Bomskov, C., Methodik der Hormonforschung
(Handbuch), 1,666o (1937)
- 10) Bürger, M., Insulin und Glucagon, Z.f.d.ges.Inn.
Med.2,311 (1947)
- 11) Bürger, M., Das Glucagon, Fortschritte d.Diagn.
und Therap.1,1 (1949)
- 12) Bürger, M., und Über das Glucagon (die hyperglykämisie-
Brandt, W., rende Substanz des Pankreas),
Z.f.d.Ges.Exp.Med.96,374 (1935)
- 13) Bürger, M., und Primäre Hyperglykämie und Glykogen-
Kramer, H., verarmung der Leber als Folge intra-
portaler Insulininjektionen nach
Untersuchungen am Hund,
Z.für Ges.Exp.Med.67,441 (1929)
- 14) Bürger, M., und Über die Wirkungsverschiedenheit tech-
Kramer, H., nischer Insuline und kristallisierter
Präparate bezüglich der primären Insulin-
hyperglykämie, Arch.exp.Path.Pharm.
156,1 (1930)

- 15) Bromen, I., und
Lund, Das Pankreas, Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere, 3,790 (1937)
- 16) Bromer, W.W., und
Sinn, L.G., und
Behrens, O.K., The amino acid sequence of Glucagon III - the hydrolysis of Glucagon by Trypsin. V - location of amino groups, acid degradation studies and summary of sequential evidence. J.Amer.Chem.Soc.79, 2801, 2807 (1957)
- 17) Burn, J.H.,
Finney, D.J., und
Goodwin, L.G., Insulin, Textbook of biological standardisation, second edition, 194 (1950)
- 18) Cassidy, G.J.,
Dworkin, S., und
Finney, W.H., The action of Insulin on the domestic fowl. Amer.J.Physiol.75, 609 (1925)
- 19) Chen, K.K.,
Robert Anderson,
und Maze, N., Susceptibility of birds to insulin as compared with mammals, J.Pharm.exp.Therap.84, 74 (1945)
- 20) Collip, J.B., Delayed manifestation of the physiological effects of insulin following the administration of certain pancreatic extracts. Amer.J.Physiol.63,391 (1923)
- 21) Consden, R.,
Gordon, A.H., und
Martin, A.P., The identification of lower peptides in Complex mixtures. Biochem.J.41,590 (1947)
- 22) Davis, J.C., Hydropic degeneration of the β -cells of the pancreatic islets produced by Synthalin A. J.Path.Bacter.64,575 (1952)
- 23) De Duve, C., und
Vuylsteke, C.A., Influence du glucagon sur l'action de l'insuline. Arch.Internat.Physiol.61,275 (1953)
- 24) Dent, C., The Amino-aciduria in Fanconi Syndrome. A study making extensive use of Techniques based on paper Partition chromatography. Biochem.J.41,240 (1947)
- 25) Dodds, E.C., und
Dickens, F., A simple method for the preparation of insulin by aqueous extraction. Lancet 1, 330 (1924)
- 26) Du Vigneaud, V.,
Fitch, A.,
Pekarck, E., und
Lockwood, W., The inactivation of Crystalline insulin by Cysteine and Glutathione. J.Biol.Chem.94,233 (1931)

- 27) Edsall, J.T., The chemistry of the proteins and
 amino acids.
 Ann.Review Biochem.16,223 (1947)
- 28) Erlenbach, F., Experimentelle Untersuchungen über
 den Blutzucker bei Vögeln.
 Z.vergl.Physiol.26,121 (1938)
- 29) Folin, O., Two revised copper methods for blood
 suger Determination.
 J.Biol.Chem.82,83 (1929)
- 30) Folin, O., und A simplified and improved method für
 Wu, H., the determination of suger.
 J.Biol.Chem.41, 367 (1919)
- 31) Fredericq, E., Reversible dissociation of insulin.
 Nature 171,570 (1953)
- 32) Fujita, A., und Bestimmung des echten Blutzuckers
 Iwatake, D., ohne Hefe.
 Biochem.Z.242, 43 (1931)
- 33) Gaede, K., Über das zweite Kohlenhydratstoffwech-
 Ferner, H., und selhormon der Bauchspeichel-Drüse
 Kastrup., H., (Glucagon) und seine Herkunft aus dem
 -Zellensystem.
 Klin.Wschr.28,388 (1950)
- 34) Grassmann, W., und Ein quantitatives Verfahren zur Ana-
 Hannig, K., lyse der Serumproteine durch Papier-
 elektrophorese.
 Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem.
 290,1 (1952)
- 35) Graßmann, W., Zur Konstitution des Insulins.
 Strobel, R., Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem.
 Hannig, K., und 305,21 (1956)
 Deffner-Plöckl,
 M.
- 36) Romori, G., A differential stain for cell types
 in the pancreas Islets.
 Amer.J.Pathol.15, 497 (1939)
- 37) Hagedorn, H.C., u. Die Ferricyanid Methode zur Blutzucker-
 Jensen, B.N., bestimmung.
 Biochem.Z.135,46 (1922); 137,92 (1922)
- 38) Harfenist, E.J., The molecular weight of Insulin.
 und Craig, L.C., 74b, 3087 (1952)
- 39) Meinzler, J., Grundtatsachen der Physiologie des
 Menschen. I. Teil, 65 München (1956)

- 40) Hittorf, Über die Wanderungen der Ionen während der Elektrolyse. F.Ostwald W.Klass.d. exakten Wissenschaften. No.21-23 (1953-1859)
- 41) Holt, C.V., Glucagon, das Hormon der -Zellen der Langerhans'schen Inseln. Z.f.Vitamin, Hormon und Fermentforsch.7,138 (1955)
- 42) Holt, C.V., Chemische Ausschaltung der -Zellen Holt, L.V., der Langerhans'schen Inseln. Arch.exp.Path.Pharm.224,66 (1955) Kröner, B., und Kükna, J.,
- 43) Honeywell, H.E., Studies of the suger in the blood of Pigeons. Amer.J.Physiol.LVII,152 (1921)
- 44) Honeywell,H.E., The action of iletin (insulin) on the und Riddle, O., blood suger of pigeons. Proc.soc. exp.biol.Med.20, 248 (1922-23)
- 45) Houssay, B., Action Comparee De l'insuline sur Sordelli, A.,und Diveres Especies Animales, Mazzocco, P., C.r.soc.Biol.Paris 11,744 (1923)
- 46) Jephcott,C.M., Extraction of insulin and stability of various preparations. Trans.Roy.soc.Canada 15,183 (1931)
- 47) Kausch, W., Der Zuckerverbrauch im Diabetes melli- tus des Vogels nach Pankreasextirpation. Arch.exp.Path.Pharm.39,219 (1897)
- 48) Koch, F.C., und Practical methods in biochemistry. Hanke, M.E., Baltimore 5 ed.200 (1948)
- 49) Koppanyi, T., The absence of permanent diabetes Ivy, A.C., following pancreatectomy in the Tatum, A.L.,und domestic fowl. Jung, F.T., Amer.J.Physiol.76,212 (1926)
- 50) Krause, R., Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere. Vögel und Reptilien. S.286 (1922)
- 51) Kumagai, T., und Studies on the internal secretion of Ukai, S., the pancreas. 16,157 (1930)
- 52) Kükenthal, W., Handbuch der Zoologie. Sauropsida: Aves. S.760 (1927-34)
- 53) La Grutta, G., Sul Meccanismi Dei Fenomeni Convulsivi Da insulina. Comportamenti Delle Anitre Sottoposte A Dosi Massive Di insulina. Boll.Della soc.ital.Biol.Sperim. 27,664 (1951)

- 54) Lane, M.A., The cytological characters of the areas of Langerhans.
Amer.J.Anat.7, 409 (1907)
- 55) Langerhans, P., Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. Diss.
(Berlin 1869)
- 56) Laqueur, E., und De Jough, S.E. Verhältnis von Dosis und Blutzuckersenkung (Konzentrationswirkungskurve) und Schwellenwert des Insulins.
Biochem.Z.163, 344 (1925)
- 57) Lehnartz, E., Einführung in die Chemische Physiologie.
S.469 (1959)
- 58) Lodge, O., The purpose of considering the subject of electrolysis in its physical and chemical bearings.
Brit.Assoc.for the advancement of science. 56,308 (1886)
- 59) MacDowell, R.J.S., Handbook of physiology and biochemistry.
40 ed. (1950)
- 60) Macleod, J.J.R., The source of insulin. A study of the effect produced on blood sugar by extracts of the pancreas and principal islets of fishes.
J.Metab.Res.2,149 (1922)
- 61) Markowitz, J., A note on the action of insulin on the blood sugar of fowl. Proc.trans.roy. soc.Canada. 19 (5), 79 (1925)
- 62) Marks, H.P., The fate of sugar disappearing under the action of insulin. Proc.roy.Soc. London. 100, 32 (1926)
- 63) Mering, J.V., und Minkowski, O., Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation.
Arch.exp.Path.Pharm.26,371 (1889)
- 64) Miller, R.A., Effect of anterior Pituitary preparations and insulin on islet cells of the pigeon pancreas.
Endocrinology 31,535 (1942)
- 65) Minkowski, O., Untersuchungen über den Diabetes mellitus nach Extirpation des Pankreas.
Arch.exp.Path.Pharm.31,85 (1893)
- 66) Mohnike, G., und Boser, H., Zum Glucagon-Problem.
Naturwiss.40,295 (1953)

- 67) Murlin, J.R., und
Kimball, C.P., Aqueous extracts of pancreas.
J.Biol.Chem. 58,337 (1923)
- 68) Noble, E.C., und
Macleod, J.J.R., Does insulin influence the glycogenic
function of the perfused liver of the
turtle? J.Physiol.58,33 (1923)
- 69) Oncley, J.L., Electric moments and relaxation times
of protein molecules.
J.Physic.Chem.44, 1103 (1940)
- 70) Opdyke, D.F., Response of fasted and non-fasted
chicks to insulin.
Endocrinology 31,363 (1942)
- 71) Piero, P.F.,
Galansino, G.,
und Pozza, G., Glucagon, a second pancreatic hormone.
Recent progress in Hormone Res.Proc.
of the Laurention Hormone Conference.
13,473 (1957)
- 72) Sanger, F., Fractionation of oxidized insulin.
Biochem.J.44,126 (1949)
- 73) Sanger, F., und
Thompson, E.O.P. The amino-acid sequence in the Glycyl
chain of insulin.
Biochem.J.53,353 (1953)
- 74) Sanger, F.,
Thompson, E.O.P.,
und Kitai, R., The amide groups of insulin.
Biochem.J.59,509 (1955)
- 75) Sanger, F., und
Tuppy, H., The amino-acid sequence in the Phenyl-
alanyl chain of insulin.
Biochem.J.49,463 (1951)
- 76) Schmitz, E., Lehrbuch der chemischen Physiologie.
S.520 (1958)
- 77) Shaffer, P.A., und
Hartmann, A.F., The iodometric determination of copper
and its use in suger analysis.
J.Biol.Chem.45,365 (1921)
- 78) Somogyi, M., Reducing non-sugers and true suger in
Human blood.
J.Biol.Chem.75,33 (1927)
- 79) Somogyi, M., A method for the preparation of blood
filtrates for the determination of
suger. J.Biol.Chem.86,655 (1930)
- 80) Sprague, R., und
Ivy, A.C., Studies in Avian varbohydrate metabo-
lism. Amer.J.Physiol.115,389 (1936)
- 81) Starling, E.H., Principles of human Physiology.
8th.ed.London (1941)

- 82) Staub, A.,
Sinn, L., und
Behrens, O.K., Purification and crystallization
of Glucagon.
J.Biol.Chem. 214, 619 (1955)
- 83) Steigerwald, H.,
und Schütte, E., Präparative elektrophoretische Dar-
stellung einer Blutzuckersteigernden
Substanz aus der Bauchspeicheldrüse.
Klin.Wschr. 31, 385 (1953)
- 84) Sturkie, P.D., Avian Physiology. Ithaca, New York
S.192 (1954)
- 85) Sutherland, E.W.,
und Cori, C.F., Influence of insulin preparations on
glycogenolysis in liver slices.
J.Biol.Chem. 172, 737 (1948)
- 86) Sutherland, E.W.,
Cori, C.F.,
Haynes, R., und
Olsen, N.S., Purification of the hyperglycemic-
glycogenolytic factor from insulin
and from gastric mucosa.
J.Biol.Chem. 180, 825 (1949)
- 87) Sutherland, E.W.u.
De Duve, C., Origin and distribution of the hyper-
glycemic-glycogenolytic factor of the
pancreas. J.Biol.Chem. 175, 663 (1948)
- 88) Tiselius, A., Elektrophorese und Adsorptionsanalyse
als Hilfsmittel zur Untersuchung hoch-
molekularer Stoffe und ihrer Zerfalls-
produkte. Die Naturwiss. 37, 25 (1950)
- 89) Vincent, S., und
Thompson, F.D., On the relations between the islets of
Langerhans and the zymogenous tubules
of the pancreas. Inter.Monatsschr.f.
Anat.und Physiol. 24, 61 (1908)
- 90) von Buddenbrock, W., Vergleichende Physiologie,
4, 98 (1950)
- 91) Weitzel, G.,
Buddecke, E.,
und Kraft, D., Zinc und Glucagon im Pankreas der
Ente. Hoppe-Seyler's Z.f.Physiol.
Chem. 305, 132 (1956)
- 92) Weitzel, G.,
Fretzdorff, A.,
Strecker, F.J.,
und Roester, U., Zinkgehalt und Glucagoneffekt kristel-
lisierter Insulinpräparate. Hoppe-
Seyler's Z.f.physiol.Chem. 293, 190 (1953)
- 93) Wiedemann, E., Neuere Entwicklungen der Elektrophorese
Methodik. Estratto dalla Rivista
(Plasma), Basel Anno I-N.3, 277 (1953)
- 94) Zagami, V., Contributo Alla conoscenza Dell'Azione
Dell'Insulina Negliuocelli. Del Dott.
Boll.Della Soc.Ital.di Biol.
Sperim. 2, 541 (1927)

Lebenslauf

Am 6.5.1929 wurde ich als Sohn des Mittelschullehrers Ibrahim Al-Gauhari, in Mit Ghamr (Ägypten) geboren. Vom Herbst 1938 bis zum Herbst 1942 besuchte ich die Volksschule in Mit Ghamr. Die ägyptische Mittelschule absolvierte ich in Mit Ghamr vom Herbst 1942 bis zum Herbst 1947 und legte anschließend mit Erfolg das Abitur ab. Daraufhin erfolgte der Besuch der ägyptischen Universität in Kairo, naturwissenschaftliche Fakultät. Im Juni 1951 bestand ich das Examen als Physiologe (Zoologie) mit der Note "Sehr Gut".

Die Tätigkeit als Assistent an der Universität Ain Schams (Kairo) übte ich zwei Jahre von 1951 bis 1953 aus. In der ägyptischen Armee war ich vom Herbst 1953 bis zum Frühjahr 1957, habe in dieser Zeit meine M.Sc.Degree gemacht. Die Veröffentlichung dieser Arbeit erfolgte in der Zeitschrift für vergleichende Physiologie, Band 41, S.26-34 (1958). Aus der Armee schied ich mit dem Range eines Oberleutnants aus. Anschließend nahm ich meine Tätigkeit als Assistent wieder auf. Seit Mai 1957 weile ich in Deutschland an der Universität München, Zoologisches Institut, zur Vorbereitung der Promovierung.

Nach erfolgreichem Abschluß werde ich in meinem Heimatland als Lehrer an der Universität Ain Schams (Kairo) tätig sein.

München, Dezember 1959

